

## **Titolo**

**Modulazione ormonale della sfera affettiva:  
studio delle risposte autonome e comportamentali indotte da stimolazione  
emotiva in soggetti con ipotiroidismo subclinico**

## Indice

<b>Riassunto e parole chiave</b>	pg. 3
<b>Introduzione e Scopo della Tesi</b>	pg. 5
<b>Materiale e Metodi</b>	pg. 11
<b>Risultati</b>	pg. 23
<b>Discussione</b>	pg. 45
<b>Appendice I</b> Sistema endocrino tiroideo	pg. 55
<b>Appendice II</b> Ipotiroidismo subclinico e alterazioni delle funzioni cardiovascolari e metaboliche	pg. 69
<b>Appendice III</b> Stimoli audiovisivi per evocare stati emotivi	pg. 72
<b>Appendice IV</b> Cenni di elettroencefalografia e applicazione dell'Analisi Componenti Indipendenti (ICA) all'elaborazione del segnale EEG	pg. 74
<b>Appendice V</b> Analisi spettrale del segnale di variabilità della frequenza cardiaca	pg. 79
<b>Appendice VI</b> Analisi delle oscillazioni spontanee (fasiche) della resistenza cutanea	pg. 82
<b>Appendice VII</b> Risultati dettagliati della valutazione neuropsicologica	pg. 85
<b>Bibliografia</b>	pg. 86

## Riassunto

Gli ormoni tiroidei (OT) svolgono un ruolo importante nell'omeostasi delle funzioni cerebrali e cardiovascolari, e una loro franca riduzione si associa a disturbi della memoria e dell'attenzione con depressione ed ansia, insieme a riduzione della contrattilità cardiaca ed aumento delle resistenze vascolari sistemiche.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di valutare se anche la presenza di un modesto rialzo del TSH ma con normali valori ematici di OT (ipotiroidismo subclinico, SHYPO) fosse accompagnata da alterazioni della sfera cognitivo/emotiva e del sistema cardiovascolare. Abbiamo quindi studiato in pazienti con SHYPO e in un gruppo di soggetti di controllo, le funzioni neuropsicologiche e l'assetto EEG e neurovegetativo in condizioni basali e la loro modulazione in condizioni di stimolazione mediante la presentazione di video a contenuto emotivo piacevole, spiacevole e neutro di controllo.

I risultati di questo studio indicano che:

1. In condizioni basali i soggetti SHYPO presentano elevati livelli di ansia di tratto e di stato a cui si associa una maggiore attività simpatica, indicata da valori più elevati del rapporto LF/HF (indice spettrale del segnale di variabilità cardiaca), e una tendenza alla desincronizzazione corticale suggerita dai più bassi livelli di attività alfa2.
2. In condizione di stimolazione i soggetti SHYPO presentano, rispetto ai controlli, intense risposte autonome simpatiche (aumento delle LF, del rapporto LF/HF e delle oscillazioni fasiche della resistenza cutanea) durante il video a contenuto spiacevole, mentre durante quello a contenuto piacevole marcati incrementi di attività rapida EEG (aumento di attività gamma e beta2).

Nel complesso questi dati indicano che nell'ipotiroidismo subclinico l'alterato assetto ormonale si associa ad una più alta suscettibilità verso qualsiasi stimolo emotivo, suggerendo, inoltre, la presenza di una certa "rigidità" di risposta dell'asse cuore-cervello.

**Parole chiave:** Ormoni tiroidei, ipotiroidismo subclinico, funzioni cognitive, emozioni, sistema nervoso autonomo, EEG, video

## Abstract

The thyroid hormones are essential to keep the cerebral and cardiovascular functions' homeostasis and their reduction is associated to memory and attention impairments with depression and anxiety, together with reduction of heart contractility and increase of vascular resistance.

The purpose of this study was to evaluate if a small increase of TSH, with normal humoral levels of thyroid hormones (subclinical hypothyroidism SHYPO) affects cognitive, emotional and cardiovascular functions.

We studied the neuropsychological functions and the EEG and autonomic *pattern* during basal conditions and during the presentation of video clips with different emotional value (amusing, aversive and neutral) in subjects with SHYPO compared to euthyroid controls.

The results show:

1. During basal conditions the SHYPO subjects have higher levels of state and trait anxiety, together with larger sympathetic activity, indicated by the higher levels of LF/HF (spectral index of heart rate variability signal), and cortical desynchronization, proved by the lower levels of Alfa2 relative power.
2. During stimulating conditions the SHYPO subjects show larger sympathetic response (higher LF, LF/HF and skin resistance's oscillations, and lower HF) and higher levels of EEG Gamma and Beta2 relative power.

The results point out that the altered hormonal pattern of subclinical hypothyroidism is associated to a higher susceptibility to any emotional stimuli. It suggests the presence of a lower flexibility of brain-heart axis.

## Key words

Thyroid, thyroid hormones, subclinical hypothyroidism, cognitive functions, emotions, Autonomic Nervous System, EEG, video.

## **Introduzione**

La condizione di omeostasi che governa la vita degli organismi superiori è sostenuta da una corretta interazione tra sistema endocrino e sistema nervoso che in tal modo assicura il loro sviluppo e la loro attività riproduttiva. Infatti, quasi tutte le secrezioni endocrine sono controllate direttamente o indirettamente dal cervello così come gran parte degli ormoni hanno la capacità di influenzare l'attività cerebrale. Le cellule nervose e quelle endocrine presentano inoltre alcune caratteristiche comuni: entrambe attivano le cellule bersaglio attraverso mediatori chimici che interagiscono con recettori specifici e molti neuropeptidi e neurotrasmettitori delle cellule nervose sono identici a quelli secreti dalle ghiandole endocrine.

Un terzo sistema, quello immunitario, gioca insieme al sistema nervoso e a quello endocrino, un ruolo fondamentale nella regolazione dell'omeostasi interna. Anche in questo caso l'interazione tra tre sistemi è reciproca, nel senso che l'attività del sistema immunitario è modulata da fattori nervosi e endocrini così come quella endocrina e nervosa sono modulate da vari fattori immunitari, come le citochine.

Tra i modelli fisiologici di interazione neuro-psico-immuno-endocrinologica, quello tiroideo evidenzia bene le complesse interazioni esistenti tra questi sistemi, infatti, se da una parte l'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide è influenzato dai neurotrasmettitori centrali, dall'altra il sistema nervoso è dipendente dagli ormoni tiroidei (OT), sia nella fase di sviluppo che nella vita adulta, ed infine la disponibilità periferica di ormoni tiroidei è influenzata dai livelli locali di citochine che a loro volta condizionano funzioni di base del sistema nervoso centrale (SNC) come il sonno e la neurogenesi ippocampale (Beck e Wasserfall, 2005).

Questa mutua interazione tra sistema ormonale tiroideo (per i dettagli fisiologici sull'argomento si rimanda all'Appendice I) e SNC si esprime anche nella modulazione di funzioni cerebrali integrate come quelle cognitive e emotive (Baldini et al., 1997).

I dati relativi a questa influenza ormonale derivano soprattutto da una abbondante letteratura clinica che mette in evidenza come l'ipotiroidismo, ovvero la condizione patologica associata ad una riduzione marcata della produzione di OT, si associ sempre a disturbi cognitivi e emotivi (Volpato et al.,

2002). Gli esatti meccanismi con cui gli OT nella vita adulta regolano le funzioni cerebrali non sono ancora noti e varie ipotesi sono tutt'ora oggetto di indagine. Le ipotesi correnti più accreditate si focalizzano sulla relazione tra OT ed alcuni neurotrasmettitori centrali (Baldini et al., 1997), quali la noradrenalina (NA), la serotonina (5HT) e l'acetilcolina (Ach). Alcuni studi hanno indicato che gli OT aumentano il numero e/o l'attività dei recettori beta-adrenergici e che, inoltre, potenziano gli effetti centrali delle catecolamine (Baldini et al., 1997). Per quanto attiene il sistema serotoninergico è stato osservato che animali adulti resi sperimentalmente ipotiroidei presentano un aumentato turnover serotoninergico nel tronco dell'encefalo ed una riduzione delle concentrazioni di 5HT e della densità dei recettori 5HT<sub>2</sub> a livello corticale. La successiva somministrazione di OT a questi animali si associa ad un incremento delle concentrazioni corticali di 5HT e ad una desensibilizzazione, limitatamente ai nuclei del rafe, degli autorecettori inibitori 5HT<sub>1A</sub>, che a sua volta induce un aumento del rilascio corticale ed ippocampale di 5HT (Bauer et al., 2002). Nell'uomo, inoltre, studi di modulazione neuroendocrina in pazienti ipotiroidei hanno mostrato una ridotta responsività serotoninergica che è del tutto reversibile dopo terapia sostitutiva con OT (Bauer et al., 2002). Infine altri studi nel modello animale hanno evidenziato che la somministrazione di OT induce un incremento ippocampale e corticale delle concentrazioni di Ach (Smith et al., 2002).

In conclusione queste evidenze sperimentali, soprattutto quelle ottenute dal modello animale, suggeriscono che gli OT presentano un forte effetto modulatorio sui sistemi noradrenergico, serotoninergico e colinergico.

Ne deriva che l'effetto degli OT si riverbera anche sulle funzioni cerebrali sostenute dai sistemi neurochimici appena descritti. A questo riguardo una notevole quantità di dati indica, sia nel modello animale che in quello umano, la presenza di strette relazioni tra funzioni cognitive ed emotive e sistema noradrenergico (Berridge e Waterhouse, 2003; Cahill, 2001), serotoninergico (Millan, 2003; Bauer et al., 2002; Riedel et al., 2002) e colinergico (Smith et al., 2002; Sarter et al., 2001; Perry et al., 1999; Bernston et al., 1998). In questa luce vanno interpretate le alterazioni delle funzioni cognitive ed emotive che si ritrovano costantemente in corso di ipotiroidismo. Tra le alterazioni cognitive ritroviamo soprattutto disturbi della memoria e della attenzione (Dugbartey,

1998) mentre tra le alterazioni della sfera emotiva si ritrovano disturbi dell'umore di tipo depressivo e disturbi d'ansia (Bauer et al., 2003; Simon et al., 2002; Bauer e Whybrow, 2001; Jackson, 1998).

Il rapporto tra funzione tiroidea e assetto emotivo non si limita solo ad ansia e depressione ma sembra essere molto più esteso in quanto alterazioni di questo sistema ormonale sono state riscontrate anche nell'agorafobia, nel disturbo di personalità tipo borderline, nell'abuso di sostanze psicotrope e nell'ampio spettro dei disturbi psicotici. In particolare lo studio dell'interazione tra l'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide e le psicosi ha una storia di circa due secoli. Fu Parry, nel 1786, a rilevare che spesso alterazioni della funzione tiroidea erano accompagnate da "varie affezioni nervose" (Parry, 1825). Basandosi su questa prima osservazione, nel 1873 Gul ipotizzava come la psicosi potesse essere la conseguenza dell'ipotiroidismo (allora chiamato mixedema) e sempre nello stesso anno la "London Clinical Society" organizzava un lavoro di ricerca sulle relazioni tra mixedema e disturbi mentali, i cui risultati, scaturiti nel 1888, mostravano come il 36% dei pazienti con mixedema presentassero "infermità mentale compresi deliri e allucinazioni". Nel 1949, Asher coniava il termine di "myxedema madness" che sottolineava come malattie tiroidee, in particolare l'ipotiroidismo manifesto, fossero spesso accompagnate da disturbi mentali. Lavori successivi hanno confermato questa comorbidità, sebbene debba essere sottolineato come gran parte di questi studi abbiano preso in considerazione solo casi di disfunzioni tiroidee manifeste non essendo allora disponibili i test di funzionalità endocrina oggi utilizzabili nelle indagini di laboratorio.

Attualmente col progredire delle conoscenze circa il funzionamento dell'asse tiroideo e con il miglioramento dell'accuratezza diagnostica l'attenzione si è focalizzata sul ruolo dei disturbi tiroidei più lievi o subclinici come fattore di innesco di disfunzioni cognitive e emotive. Si sta infatti dimostrando che le alterazioni cognitivo-emotive non caratterizzano solo l'ipotiroidismo franco ma vengono considerate, seppur in maniera più sfumata, come una delle componenti della costellazione sintomatologica che si ritrova in corso di ipotiroidismo subclinico (SHYPO) (The Lewin Group, 2002).

L'ipotiroidismo subclinico rappresenta un'iniziale disfunzione del metabolismo tiroideo caratterizzata dalla normalità dei valori di concentrazione ematica di

triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), e da un modesto rialzo della tireotropina (TSH) (Surks et al., 2004).

Da un punto di vista eziopatogenetico, nella maggior parte dei casi l'ipotiroidismo subclinico è sostenuto da una tiroidite cronica su base autoimmune: si stima infatti che tra i pazienti con SHYPO il 67% delle donne e il 40% degli uomini presentino elevati livelli sierici di anticorpi antitiroide. Nei rimanenti casi invece, questa patologia è sostenuta da cause iatrogene, rappresentando un effetto collaterale della terapia della tireotossicosi oppure del trattamento con farmaci come il litio o l'amiodarone (Ross 2000).

L'ipotiroidismo subclinico è una condizione molto frequente, in particolare fra le donne, con un'incidenza fra il 2 e il 20% della popolazione adulta (Surks et al., 2004) i cui effetti non riguardano solo il SNC ma anche quello cardiovascolare e metabolico (per ulteriori dettagli si rimanda all'Appendice II).

Per quanto riguarda la modulazione delle funzioni cognitive in corso di SHYPO, i pochi studi effettuati si sono focalizzati sulla valutazione delle prestazioni cognitive basali, e in alcuni casi, sul cercare di individuare eventuali cambiamenti dopo terapia specifica con L-tiroxina. Alcuni lavori, utilizzando come strumento neuropsicologico la Wechsler Memory Scale, hanno messo in evidenza che l'ipotiroidismo subclinico si associa ad una compromissione dell'attenzione e delle capacità mnesiche (Haggerty et al., 1990; Monzani et al., 1993). Un aspetto importante è la reversibilità del disturbo cognitivo, soprattutto quello a carico della memoria, dopo trattamento con L-tiroxina (Baldini e Vita, 1997).

Più contraddittori sono invece i dati sulle alterazioni della sfera affettiva, infatti se in generale questi studi conferiscono all'ipotiroidismo subclinico un ruolo come fattore di rischio nell'insorgenza di disturbi dell'umore e d'ansia, non riescono invece a stabilire un'esatta correlazione fisiopatologia tra SHYPO e alterazioni psicopatologiche.

Le prime osservazioni su una eventuale relazione tra la disfunzione tiroidea subclinica ed elementi psicopatologici affettivi sono relativamente recenti; nel 1992 Haggerty et al. hanno rivelato che l'incidenza di depressione nei soggetti SHYPO è più del doppio di quella presente nella popolazione generale (53% vs 20%). Successivamente questa stretta relazione con la patologia affettiva è



stata messa in discussione dallo studio di Vandoolaeghe et al (1997) che non hanno trovato alcuna relazione tra l'ipotiroidismo subclinico e depressione.

Analoga discordanza è presente anche per l'ansia; infatti, se da un lato Monzani et al (1993) e Gonen (2004) trovano una maggiore quantità d'ansia nei soggetti SHYPO, dall'altro Baldini et al. (1997) e Engum (2002) non mettono in evidenza significative rispetto ai controlli eutiroidei.

L'approccio utilizzato da questi studi è solamente di tipo fenomenico, il cui scopo è quello di identificare una relazione causale tra SHYPO e alterazioni del SNC solo mediante scale psicometriche neuropsicologiche o psicopatologiche senza effettuare misure strumentali biologiche. L'unico studio, a nostra conoscenza, che ha cercato di identificare una modificazione di funzionamento cerebrale nei soggetti affetti da SHYPO rispetto ai controlli è quello di Jensovsky et al. (2002). In questo studio mediante la tecnica dei potenziali evento correlati di tipo visivo si è trovato che la latenza media dell'onda P300 nei pazienti SHYPO era significativamente maggiore rispetto ai controlli. Aspetto sicuramente affascinante della ricerca è che dopo sei mesi di trattamento con L-tiroxina e conseguente normalizzazione dei livelli di TSH, il tempo di latenza della P300 era tornato a valori sovrapponibili a quelli dei controlli.

In conclusione, la rilevanza clinica di questa condizione è ancora incerta, nonostante alcune evidenze abbiano messo in luce effetti negativi a lungo termine sulle funzioni cognitive, emotive e cardiovascolari. Come abbiamo visto, fino ad oggi lo studio del ruolo degli OT in pazienti con ipotiroidismo subclinico nella modulazione delle funzioni cerebrali appare limitato all'identificazione di pattern neuropsicologici e psicopatologici. La maggior parte degli studi, infatti, utilizza solo valutazioni psicometriche e questo approccio presenta dei limiti metodologici che probabilmente rendono conto della variabilità di risposta nei diversi gruppi di pazienti studiati. In nessun studio, inoltre, è stata effettuata alcuna valutazione obiettiva delle funzioni cognitive ed emotive mediante lo studio dell'attività elettrica cerebrale o dell'uscita autonoma.

**Scopo della tesi**

Sulla base delle evidenze sperimentali raccolte nei pochi studi ottenuti nell'uomo circa il coinvolgimento degli ormoni tiroidei (OT) nella modulazione delle funzioni cognitive ed emotive in pazienti con SHYPO, lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di indagare sistematicamente il ruolo svolto dagli OT nella modulazione delle risposte elettriche cerebrali (mediante EEG) e dell'uscita neurovegetativa (mediante ECG, respirogramma e resistenza cutanea) durante stimoli cognitivi e stati di elevato coinvolgimento emotivo.

Al fine di evocare nei pazienti con SHYPO in modo riproducibile e maggiormente controllato una serie di risposte centrali e periferiche legate ad un aumento acuto dei livelli d'ansia, la modulazione dell'assetto cognitivo ed emotivo è stata effettuata mediante stimolazioni visive dinamiche (video clip) standardizzate (Per ulteriori dettagli si rimanda all'Appendice III).

La dimostrazione di un controllo ormonale del Sistema Nervoso Centrale non solo rappresenterebbe una prova a favore delle teorie che vedono il sistema endocrino umorale coinvolto in funzioni inerenti alla sfera affettiva e cognitiva ma assumerebbe una notevole importanza clinica nell'interpretazione fisiopatologica dei disturbi della sfera cognitiva, emotiva e cardiovascolare che rappresentano una componente sintomatologica importante della disfunzione tiroidea.

## **MATERIALE E METODI**

### **Soggetti**

Sono stati studiati 10 soggetti di sesso femminile di età compresa tra i 18 e i 35 anni affetti da ipotiroidismo subclinico (SHYPO) in accordo ai criteri della American Thyroid Association (ATA), della American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) e della Endocrine Society (ES), cioè con valori di TSH al di sopra dei limiti alti di riferimento (4.5 microU/ml) e con valori normali di fT3 e fT4. Come soggetti di controllo sono stati studiati 10 volontari sani comparabili per sesso, età ed estrazione socio-culturale.

La scelta di un campione omogeneo per il sesso è legata principalmente alla più alta incidenza di ipotiroidismo subclinico nel sesso femminile ed inoltre, in accordo ad alcune evidenze sperimentali, le risposte emotive più accentuate si ritrovano più facilmente nelle femmine rispetto ai maschi (Gross & Levenson, 1995).

Tutti i soggetti hanno ricevuto un'accurata anamnesi clinica per escludere concomitanti patologie organiche, neurologiche e psichiatriche ed eventuali trattamenti farmacologici in grado di alterare la risposta neurovegetativa e comportamentale di base.

Ogni soggetto SHYPO ed ogni volontario sano ha firmato un consenso informato scritto approvato dal Comitato Etico del CNR in cui viene descritta la procedura ed i rischi dell'esperimento ed in cui si afferma il loro diritto a sospendere la partecipazione allo studio in ogni momento

### **A) CARATTERIZZAZIONE DI BASE**

#### *A.1) Valutazione ormonale*

Ogni soggetto è stato sottoposto ad una valutazione dei livelli sierici di TSH, T3, T4, fT3, fT4, Adrenalina, Noradrenalina, Dopamina, Cortisolo ed ACTH.

#### *A.2) Valutazione neuro-psicologica*

Ogni soggetto è stato sottoposto ad una completa serie di test neuropsicologici per valutare alcune funzioni cognitive, come la fluenza

verbale, l'attenzione, la memoria e l'intelligenza fluida, ed affettive come l'ansia di tratto e di stato e l'umore (APPENDICE VII).

La valutazione delle funzioni neuropsicologiche rappresenta una componente rilevante di questo lavoro di tesi in quanto l'ipotiroidismo subclinico è una condizione di particolare vulnerabilità a disturbi della sfera cognitiva e emotiva (Haggerty et al., 1992, Monzani et al., 1993; Vandoolaeghe et al., 1997; Baldini et al., 1997; Engum et al., 2002; Gonen et al., 2004).

Lo studio delle funzioni cognitive ed emotive è stato effettuato mediante le seguenti scale di valutazione standardizzate:

### 1. Wechsler Memory Scale (WMS - Cognitiva)

Si tratta di un test utilizzato per la valutazione del declino cognitivo e rappresenta un rapido strumento per la quantificazione delle abilità cognitive globali e delle loro modificazioni nel tempo. Nel nostro studio sono state prese in considerazione determinati item:

- *WMS-informazioni*: i soggetti devono rispondere ad informazioni di cultura generale (propria età, nome del Presidente della Repubblica, del sindaco, ecc). Individua eventuali segni di afasia e deficit di memoria.
- *WMS-orientamento*: i soggetti devono rispondere a cinque domande riguardo all'anno, il mese, il giorno, il posto e la città in cui si trovano. Individua eventuali segni di afasia e deficit di memoria.
- *WMS-controllo mentale esecutivo*: i soggetti devono contare da 20 a 1, ripetere le lettere dell'alfabeto, contare in modo che ogni numero sia separato dal successivo per tre unità. Individua eventuali segni di afasia e deficit di memoria.
- *WMS-ripetizione di cifre*: i soggetti devono ripetere un elenco di cifre; valuta la memoria a breve termine.
- *WMS-ripetizione inversa*: i soggetti devono ripetere un elenco di cifre in ordine inverso; valuta la memoria a breve termine.
- *WMS-riproduzione visiva*: i soggetti devono ripetere immediatamente, a memoria, dei disegni geometrici; valuta la memoria visiva.

- *WMS-associazione di parole*: i soggetti devono ricordare delle associazioni di parole (quando l'esaminatore richiama una parola, devono dire quella associata); valuta le capacità di ritenzione mnesica.
- *WMS-quotiente di memoria (QM)*: si ottiene in base ai risultati dei test precedenti, corretti per l'età; valuta la capacità mnemonica globale dell'individuo.

## 2. Matrici di Raven (Cognitiva)

Si tratta di un test di intelligenza logico-deduttiva su dati visuo-spaziali. Ognuna delle 36 tavole che formano il test si compone di una parte superiore che contiene la figura stimolo e una parte inferiore che contiene 6 alternative di risposta. La figura stimolo risulta in tutti i casi mancante di un frammento e al paziente viene chiesto di osservare attentamente lo stimolo e di indicare, tra le 6 alternative di risposta, quella che lo completa.

## 3. TAI e Cubi di Kohs Starter (Cognitiva)

- *Compiti eseguiti*: i soggetti devono riprodurre dei disegni di difficoltà crescente usando dei cubi colorati; valuta l'efficienza intellettuale, la percezione spaziale.
- *Punteggio*: i soggetti devono riprodurre dei disegni di difficoltà crescente usando dei cubi colorati; valuta l'efficienza intellettuale, la percezione spaziale.

## 4. Digit Span - memoria di cifre

Test per la valutazione della memoria verbale a breve termine. Obiettivo è di valutare la capacità di mantenere l'attenzione concentrata su un compito inibendo le attività concorrenti e di misurare la capacità di richiamo immediato in sequenza ordinata di dati cognitivi presentati verbalmente.

## 5. Fluidità verbale

Il test valuta l'estensione e la fruibilità del magazzino di memoria semantico lessicale.

## 6. WAIS cifrario

Ai soggetti è chiesto di associare dei simboli a determinati numeri. Il test valuta la velocità di apprendimento.

## 7. Corsi

Test per la valutazione della memoria a breve termine visuo-spaziale.

## 8. EMAS - Endler Multidimensional Anxiety Scale (Emotiva)

Scala multidimensionale di valutazione del livello di ansia di tratto, di stato e di percezione della situazione relativo a quattro contesti generali: situazioni di valutazione sociale, situazione di pericolo fisico, situazioni ambigue e situazioni di routine quotidiana.

## 9. POMS- Profile of Mood States (Emotiva)

Il test studia sei fattori dell'umore: Tensione-Ansia (T), Depressione-Avvilimento (D), Aggressività-Rabbia (A), Vigore-Attività (V), Stanchezza-Indolenza (S) e Confusione-Sconforto (C).

Ai soggetti è stata valutata anche la lateralizzazione emisferica tramite l'Edinburgh Handedness Inventory (EHI)

La valutazione neuro-psicologica, della durata di circa un'ora e mezzo, veniva effettuata il giorno precedente la valutazione delle risposte neurovegetative e comportamentali alla presentazione di filmati ad elevato contenuto emotivo.

## **B) PARADIGMA SPERIMENTALE PER LO STUDIO DELLE VARIABILI NEUROVEGETATIVE E COMPORTAMENTALI**

### *B1) Disegno sperimentale e stimoli*

Durante ogni seduta di registrazione, della durata di circa 1 ora, i soggetti sono stati fatti accomodare in posizione semisupina su un apposito lettino in penombra. L'apparato sperimentale è stato posizionato alle spalle dei soggetti mentre lo schermo di proiezione (LCD Sony 17") dei videoclip è stato posto all'altezza degli occhi del soggetto, a circa 1 metro e mezzo di distanza. Il lettino, le apparecchiature e il complesso con il monitor per la proiezione si

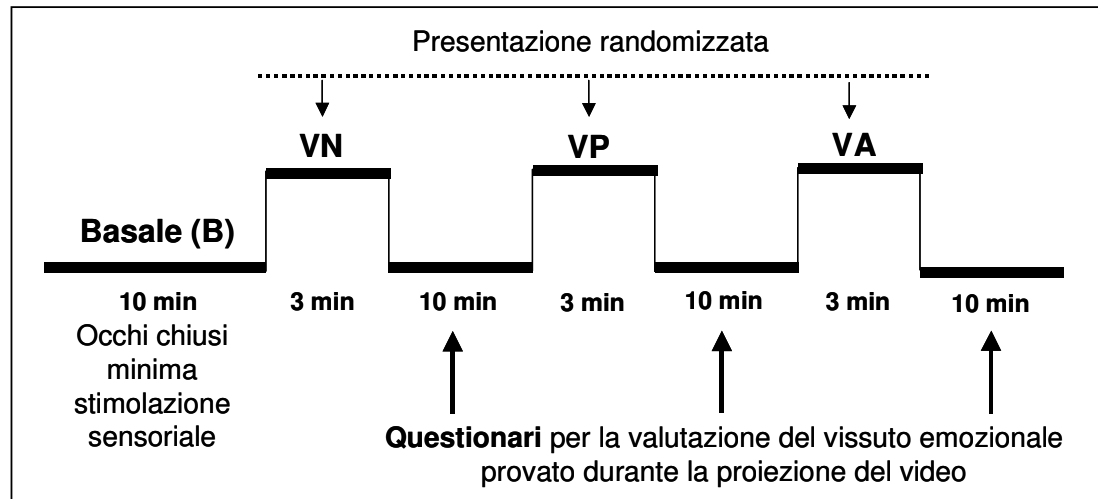
possono muovere indipendentemente per garantire la corretta disposizione per ogni soggetto.

Sono stati selezionati 7 videoclip, di cui due spiacevoli, due piacevoli e tre neutri, in accordo con le indicazioni della letteratura (Gross & Levenson, 1995; Rosenberg et al., 2005; Shaefer et al., 2005). Sono stati scelti i filmati più rappresentativi per ogni categoria emotiva, ovvero quelli che negli studi di standardizzazione possiedono i punteggi più elevati per quanto riguarda l'intensità e la specificità del *target* emotivo; a questo riguardo, nell'ambito dei film avversivi sono stati scelti quelli che evocano paura, in quanto emozione evolutivamente più significativa tra quelle a carattere negativo; le emozioni a carattere piacevole non pongono lo stesso problema di specificità poiché in genere non si fa molta distinzione tra diversi tipi di stimoli positivi.

I video avversivi sono stati estratti dai film "La strega di Blair" e da "The others" e i video piacevoli dai film "Tutti pazzi per Mary" e da "Ti presento i miei". Per quanto riguarda i video di controllo, cioè quelli a contenuto emotivo neutro, la scelta è stata effettuata in accordo alle indicazioni della letteratura (Gross & Levenson, 1995; Rottenberg et al., 2005; Shaefer et al., 2005) cercando filmati di "TV shopping" o dei bollettini meteorologici. I tre video a contenuto emotivo neutro utilizzati in questo studio sono un breve filmato estratto da una lezione televisiva del "Consorzio Nettuno", una parte di un bollettino meteorologico e un messaggio pubblicitario (Appendice III).

La presentazione dei filmati (tutti della durata di 3 min.) è stata randomizzata, secondo il disegno sperimentale schematicamente rappresentato in Fig. 1

All'inizio di ogni videoclip, al fine di favorire la concentrazione e l'attenzione sullo stimolo, è stato aggiunto 1 min. di filmato consistente in uno sfondo nero della durata di 50 sec. cui seguono 10 sec. in cui sullo stesso sfondo viene visualizzato un conto alla rovescia.



**Fig.1:** Paradigma sperimentale. B= periodo di registrazione basale in condizioni di minima stimolazione sensoriale; VN= video neutro; VP= video piacevole; VA= video avversivo.

Al termine della visione di ogni film è stata richiesta ad ogni soggetto la compilazione di una scala semi-strutturata per valutare il vissuto emotivo che ha provato durante la visione; la scala è una versione tradotta in italiano di quella suggerita da Rottenberg et al. (2005) e richiede un tempo di 10-15 minuti per la compilazione.

Il questionario comprende due scale da 0 a 8 per la valutazione del vissuto emotivo: la prima chiede al soggetto di attribuire un valore al filmato per singole tipologie emotive (rabbia, paura, gioia, ecc.), la seconda per valenza generale dello stimolo (piacevole/spiacevole). Inoltre si chiede se il soggetto ha già visto altre volte il filmato e se ha distolto lo sguardo durante la presentazione del videoclip.

Mentre i valori acquisiti tramite la seconda scala del questionario (valenza generale dello stimolo) sono stati analizzati senza alcun pre-trattamento, quelli derivanti dalla valutazione degli stati emotivi discreti sono stati sottoposti ad un raggruppamento, sommando i punteggi di "divertimento", "felicità", "gioia",



“amore”, “fierezza” e inserendoli nella categoria “piacevolezza”. Sono stati classificati come spiacevoli “rabbia”, “ansia”, “lamento”, “disgusto”, “imbarazzo”, “paura”, “senso di colpa”, “tristezza” e “infelicità”. La ragione dell’uso di questa doppia scala è di confrontare un modello di valutazione “istantaneo” da parte del soggetto con uno più elaborato, in cui la somma di valutazioni parzialmente ripetute potrebbe fornire nel complesso una misura più affidabile dello stato emotivo soggettivo.

### *B2) Acquisizione delle variabili comportamentali e neurovegetative*

Tutte le sessioni di registrazione sono state effettuate nella stessa fascia oraria (dalle 15.00 alle 19.00) per evitare modificazioni dell’assetto basale neurovegetativo, comportamentale e cognitivo legate alle fluttuazioni circadiane. La temperatura e l’umidità della stanza sono state monitorate durante tutti gli esperimenti.

Gli effetti sulle variabili comportamentali e neurovegetative sono stati studiati mediante la registrazione in continuo dell’elettroencefalogramma (EEG), dell’elettro-oculogramma (EOG), dell’elettrocardiogramma (ECG), dell’attività respiratoria (AR) e della resistenza cutanea (RC).

### Studio delle variabili comportamentali

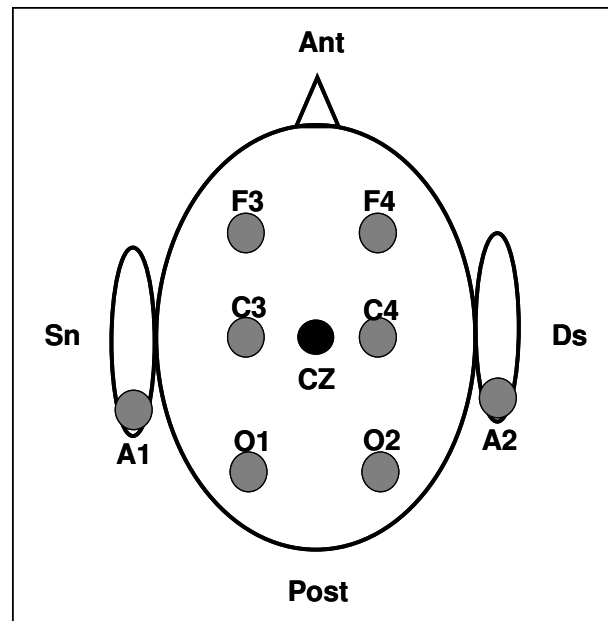
Per lo studio dell’ EEG e dell’ EOG , sono stati utilizzati elettrodi Ag/AgCl<sup>1</sup>. L’EEG è stato acquisito in derivazione bipolare con gli elettrodi posizionati bilateralmente sullo scalpo nelle regioni frontali (F3 - F4), centrali (C3 - C4), posteriori (O1 - O2) e ai lobi auricolari collegati a dare un’unica derivazione (A1-A2), tutti riferiti verso un elettrodo indifferente al centro dello scalpo (Cz). In sede di elaborazione dei dati, è stato effettuato un re-referenzamento di tutti gli elettrodi dello scalpo alla derivazione A1-A2, escludendo Cz, al fine di minimizzare gli effetti della differenza di tensione tra le due orecchie e di amplificare le eventuali lateralizzazioni (Fig. 2).

---

<sup>1</sup> d= 8mm; impedenza < 10 K.

I segnali sono stati opportunamente amplificati<sup>2</sup> e filtrati<sup>3</sup>. Le bande di frequenza EEGrafiche considerate nello studio sono state definite nel modo seguente: delta (0.5-4 Hz), teta1 (4-6 Hz), teta2 (6-8 Hz), alfa1 (8-10 Hz), alfa2 (10-12 Hz), beta1 (12-20 Hz), beta2 (20-36 Hz) e gamma (36-44Hz).

I segnali EEG ed EOG così acquisiti sono stati digitalizzati con una frequenza di campionamento di 250Hz.



**Fig.2: Montaggio EEG**

F3= frontale sinistro; F4= frontale destro; C3= centrale sinistro; C4= centrale destro; Cz= centrale linea mediana; O1= occipitale sinistro; O2= occipitale destro; Sn= sinistra; Ds= destra

### Pretrattamento dei dati:

Sono stati presi in considerazione gli spettri di potenza dei segnali EEGrafici. Ciascuno spettro è stato calcolato mediante periodogramma basato su FFT (Fast Fourier Transform), utilizzando finestre di Hanning aventi un overlapping di 1 secondo, su epoche di 2 secondi. Per ottenere le potenze delle sottobande, sono stati sommati i valori la cui frequenza si riferisce all'intervallo di ciascuna

<sup>2</sup> EEG: gain=100K; EOG: gain = 1K

<sup>3</sup> EEG: *low pass* < 100 Hz e *high pass* > 0.3 Hz; EOG: *low pass* < 30 Hz e *high pass* > 0.3 Hz. Un filtro *notch* è stato posto a 50Hz.

sottobanda, ovvero è stato fatto l'integrale dello spettro dell'area sottesa dall'intervallo di banda.

Questo approccio permette di ottenere lo spettro di potenza totale e quello relativo per ogni sottobanda considerata. Per questo lavoro di tesi sono stati considerati i valori relativi ottenuti per ogni sottobanda mediante la seguente formula:

$$\frac{[valore_{epoca}]}{[potenza_{totale}] - [potenza_{delta}]} \times 100$$

Per valore dell'epoca si considera il valore spettrale di un elettrodo ( per esempio F3) in una determinata condizione sperimentale (per esempio durante il video a contenuto emotivo piacevole), per potenza totale si intende la somma degli spettri di potenza nello stesso elettrodo (F3 nel nostro esempio) nella condizione sperimentale (VP) e per potenza delta, l'attività spettrale nella frequenza 0.5-4Hz nell'elettrodo (F3) durante condizione sperimentale considerata (VP).

Il segnale EO Grafico è stato trattato con un filtro passabanda<sup>4</sup> al fine di depurare l'EOG dall'attività muscolare e EEG ad alta frequenza e consentire una caratterizzazione dell'ammiccamento (blink oculare). Marcati artefatti da movimento sull'EOG sono stati rimossi in maniera automatica considerando la discontinuità di ampiezza che essi producono nel segnale.

#### *Rimozione degli artefatti EEG e caratterizzazione EOG:*

I segnali EEG generalmente vengono inquinati da segnali di diversa sorgente (per es. oculare, muscolare, cardiaca), che in genere non possono essere eliminati mediante un filtro passabanda. In questo studio sono state effettuate le correzioni degli artefatti EEG mediante la ricostruzione dei segnali interferenti, ottenuta con la "Analisi delle Componenti Indipendenti" (ICA)<sup>5</sup> (Makeig e coll., 1996; Jung e coll., 1998). Questo tipo di tecnica presuppone che:

- il segnale rilevato sia derivato da una combinazione di segnali provenienti da sorgenti di natura distinta

---

<sup>4</sup> EOG: *low pass* <10 Hz e *high pass* >0.1 Hz

<sup>5</sup> ICA = Independent Component Analysis

- la combinazione avvenga in modo lineare e
- che le sorgenti siano statisticamente indipendenti.

Sebbene la tecnica non richieda l'esplicita rilevazione dei segnali inquinanti la loro disponibilità ha consentito un trattamento migliore del segnale EEG-grafico (Per ulteriori dettagli si rimanda all'Appendice IV).

Per quanto concerne la lateralizzazione dell'attività cerebrale nelle differenti bande frequenziali, essa è stata ottenuta in base alla formula:

$$\frac{X_{sinistra} - X_{destra}}{X_{sinistra} + X_{destra}}$$

dove X è il valore della potenza EEG in una data banda frequenziale, condizione sperimentale ed elettrodo.

La caratterizzazione dell'ammiccamento oculare è stata condotta individuando i singoli eventi di blink per calcolare gli intervalli tra di essi e quindi ricavare la frequenza media e la variabilità totale di tali intervalli.

#### Studio delle variabili neurovegetative

Per l'acquisizione dell'ECG sono stati utilizzati elettrodi di tipo clinico (Red Dot™ Ag/AgCl), per la frequenza respiratoria (RF) è stato utilizzato un trasduttore polimerico piezoelettrico in DC applicato intorno al torace.

I segnali, opportunamente amplificati<sup>6</sup> e filtrati<sup>7</sup>, sono stati digitalizzati a 250 Hz.

Lo studio della resistenza cutanea (componente fasica) è stato effettuato mediante elettrodi di superficie (Ag/AgCl) applicati sull'eminanza tenar ed ipotenar.

#### *Pretrattamento dei dati*

L'estrazione delle serie RR (serie degli intervalli di tempo tra battiti consecutivi) dal segnale cardiaco è stata affidata a un algoritmo basato su approccio

---

<sup>6</sup> ECG: *gain* = 1K; RA *gain* = 10K

<sup>7</sup> ECG: *low pass* < 100 Hz e *high pass* > 1 Hz

derivativo per il riconoscimento automatico di un “punto fiduciale” nel complesso QRS.

Ogni serie RR è stata interpolata a 2Hz ed è stato operato un *detrend* del segnale RR per evitare la sovrastima delle potenze a bassa frequenza ( $<0.01$  Hz) della variabilità cardiaca ed eventuali influenze sui valori di picco relativi alle altre bande di frequenza.

Lo spettro del segnale di variabilità cardiaca è stato calcolato mediante modello non parametrico (FFT), secondo l'elaborazione del programma HRV Analysis (Versione 1.1, Biomedical Signal Analysis Group, Università di Kuopio, Finlandia – per ulteriori dettagli: Niskanen et al., 2004) (vedi appendice V).

Per quanto concerne la resistenza cutanea, il segnale è stato preventivamente filtrato con una tecnica di “*smoothing*” polinomiale non parametrica (“cubic splines”; per i dettagli della tecnica di analisi si rimanda all'Appendice VI).

#### *Trattamento dei dati*

Per l'analisi del segnale di variabilità cardiaca, abbiamo considerato la densità spettrale in due bande frequenziali, LF (0.04-0.15 Hz) ed HF (0.15-0.4 Hz), poiché è stato ritenuto troppo breve il periodo di acquisizione (3 min.) per valutare anche le oscillazioni più lente VLF (0.001-0.04).

La potenza relativa a ciascuna banda (componenti LF ed HF) è stata ottenuta calcolando l'area dello spettro di potenza sottesa dal corrispondente intervallo frequenziale di banda.

Le componenti LF ed HF sono state studiate in unità normalizzate (Pagani e coll., 1986, Montano e coll., 1994). Per ciascuno spettro è stato poi identificato il rapporto LF/HF (indice di equilibrio simpato-vagale), secondo i criteri proposti dalla Task Force of the European Society of Cardiology and North American Society of Pacing and Electrophysiology (1996) (per ulteriori dettagli sul trattamento del segnale di variabilità cardiaca si rimanda all'Appendice V).

Per la rilevazione dell'attività respiratoria sono stati calcolati i tempi espiratori, inspiratori e respiratori istantanei e conseguentemente la frequenza respiratoria istantanea. Sono stati analizzati alcuni indici di distribuzione di tali parametri (mediana, ampiezza interquartile, asimmetria e curtosi non parametriche)

Per la resistenza cutanea sono state prese in esame le oscillazioni spontanee (fasiche) non evento correlate (per ulteriori dettagli sul trattamento del segnale di resistenza cutanea si rimanda all'Appendice VI).

### **Analisi statistiche**

Il confronto SHYPO vs CONTROLLI relativo ai test neuropsicologici e ai questionari di autovalutazione è stato effettuato mediante analisi della varianza multivariata (ANOVA).

Il confronto SHYPO vs CONTROLLI relativo e alle condizioni basali (parametri neurovegetativi, EEG e EOG) è stato effettuato mediante ANOVA multivariata.

Per quanto attiene le condizioni di stimolazione, ciascun parametro neurovegetativo (FC, FR, LF, HF, LF/HF e RC) è stato analizzato mediante ANOVA per misure ripetute secondo il seguente disegno statistico: 2 Gruppi (CONTROLLI, SHYPO) x 3 Condizioni (VN, VP, VA), con Condizioni come fattore entro gruppo mentre Gruppo come fattore tra gruppi.

La potenza relativa di ciascuna banda spettrale EEG (gamma, beta2, beta1, alfa2, alfa1, teta2, teta1), previa trasformazione in arcoseno della sua radice quadrata, è stata analizzata mediante ANOVA per misure ripetute con il seguente disegno sperimentale: 2 Gruppi (CONTROLLI, SHYPO) x 6 Elettrodi (F3, F4, C3, C4, O1, O2) x 3 Condizioni (VN, VP, VA), con Elettrodi e Condizioni come fattori entro gruppo e Gruppo come fattore tra gruppi. Le analisi successive sono state effettuate mediante "analisi dei contrasti".

Il livello di significatività è stato fissato a  $p < 0.05$

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il programma SPSS 11.5 (SPSS Inc.).

## RISULTATI

### A) Sintesi dei risultati principali

#### Valutazione neuropsicologica e di autovalutazione

Per quanto riguarda le funzioni cognitive, il confronto tra i soggetti SHYPO e quelli di controllo non ha evidenziato alcuna differenza, mentre per quanto attiene le funzioni emotive i soggetti SHYPO presentano, rispetto ai controlli, livelli più elevati di ansia, sia di stato che di tratto.

Per quanto riguarda l'autovalutazione del vissuto emotivo, i soggetti SHYPO hanno presentato valori di emozioni negative significativamente superiori a quelli dei soggetti di controllo, mentre non si osservano differenze per quanto attiene quelle positive.

#### Risposte neurovegetative

- **Frequenza cardiaca e respiratoria**

Le frequenze cardiaca e respiratoria non hanno mostrato significativi cambiamenti durante le condizioni di stimolazione sia nei soggetti di controllo che nei soggetti SHYPO. Il confronto tra i due gruppi sperimentali in condizioni basali e di stimolazione non mette in evidenza alcuna differenza.

- **Indici spettrali (LF e HF):**

I soggetti SHYPO mostrano già basalmente livelli di LF e di HF rispettivamente superiore e inferiore rispetto ai controlli; in condizione di stimolazione tale differenza diventa significativa durante il video spiacevole.

Analogamente al comportamento delle LF e HF, anche il rapporto LF/HF in condizioni basali è significativamente più elevato nei soggetti SHYPO. Tale differenza si mantiene in condizioni di stimolazione, in particolare durante lo stimolo avversivo.

- **Resistenza cutanea**

In linea con i dati relativi al rapporto LF/HF, i soggetti SHYPO presentano già in condizioni basali una maggiore frequenza di oscillazioni spontanee della risposta elettrodermica rispetto ai controlli; tale differenza diventa ancora più importante e significativa durante lo stimolo avversivo.

Le variazioni degli indici di attività simpato-vagale, quali le LF e HF, il loro rapporto e le oscillazioni spontanee della resistenza cutanea indicano che nei soggetti SHYPO è presente uno spostamento dell'equilibrio simpato-vagale verso una predominanza simpatica; tale spostamento diventa ancora più significativo durante la stimolazione emotiva, in particolare quella a contenuto negativo.

#### Risposte comportamentali

Nell'ambito dell'EEG, l'alfa2 è l'unico ritmo che in condizioni basali distingue i soggetti SHYPO dai controlli; in generale i controlli presentano una percentuale di alfa2 superiore rispetto agli SHYPO, differenza che risulta significativa nelle regioni posteriori destra e sinistra.

- **Attività gamma**

I soggetti SHYPO presentano un comportamento completamente differente dai soggetti di controllo. In generale i soggetti SHYPO presentano durante tutte le condizioni di stimolazione una maggiore percentuale di attività gamma. Questo incremento diventa ancora più marcato nella condizione di stimolazione piacevole in cui è significativamente differente dai controlli e dalle altre due condizioni sperimentali.

- **Attività beta**

Analogamente all'attività gamma, i soggetti SHYPO presentano, soprattutto in condizione di stimolazione piacevole un incremento significativo di beta2; non sono stati osservati cambiamenti dell'attività beta1.

- **Attività alfa**

I ritmi alfa nei soggetti normali non mostrano differenze tra le tre condizioni sperimentali, mentre si osservano differenze nei soggetti SHYPO dove i valori percentuali di alfa1 e alfa2 si riducono significativamente nello stimolo piacevole rispetto alle altre due condizioni sperimentali.

- **Attività teta**

I ritmi teta sia nei soggetti SHYPO che in quelli di controllo non presentano modificazioni legate alle condizioni di stimolo.



In conclusione la differenza fondamentale osservata nei soggetti SHYPO rispetto al gruppo di controllo è rappresentata:

- basamente da maggiori livelli di ansia a cui si associa uno spostamento dell'equilibrio simapato-vagale verso una predominanza simpatica, e
- in condizioni di stimolazione da una maggiore reattività EEG e autonoma alle stimolazioni emotive.

## B) Risultati dettagliati

I risultati di questo lavoro di tesi riguardano 18 soggetti destrimani (EHI >16) di sesso femminile, 9 con ipotiroidismo subclinico (SHYPO) e 9 di controllo (C), selezionati secondo i criteri descritti nel capitolo Materiale e Metodi. Due soggetti sono stati esclusi dall'analisi statistica per problemi rilevati durante l'acquisizione.

I soggetti sono comparabili per età (SHYPO:  $27.5 \pm 2.3$ ; C:  $25.5 \pm 1.3$ ) e variabili socioculturali.

I dati di questo lavoro di tesi riguardano:

- 1) la caratterizzazione basale delle funzioni neuropsicologiche, emotive, neurovegetative e comportamentali del campione.
- 2) la caratterizzazione in condizione di stimolazione del vissuto emotivo e delle variabili neurovegetative e comportamentali durante la presentazione di un video a contenuto piacevole (VP), di uno a contenuto avversivo (VA) e di uno di controllo a contenuto neutro (VN).

### B1) CARATTERIZZAZIONE DI BASE

#### 1) Valutazione ormonale

Come era lecito attendersi, i due gruppi sperimentali differiscono solamente per i livelli sierici dell'ormone TSH, che sono significativamente più elevati nei soggetti SHYPO rispetto ai controlli ( $F(1,16)=93.730$ ;  $p<.0001$ ). I valori medi ( $\pm$ SEM) dei differenti ormoni valutati sono riportati in tabella 1.

parametri	SHYPO	Controlli	Valori di riferimento
TSH	<b><math>5.01 \pm 0.2^{***}</math></b>	$2.12 \pm 0.2$	$0.3-3.80 \mu\text{U/mL}$
T3	$112.2 \pm 2.5$	$119.0 \pm 2.2$	$70-170 \text{ ng/dL}$
T4	$6.9 \pm 0.8$	$7.1 \pm 0.2$	$4.5-12 \mu\text{g/dL}$
fT3	$2.5 \pm 0.8$	$2.6 \pm 0.1$	$2.10-4.20 \text{ pg/mL}$
fT4	$11.2 \pm 0.4$	$11.4 \pm 0.4$	$7.1-18.5 \text{ pg/mL}$
Adrenalina	$31.9 \pm 4.0$	$29.6 \pm 3.4$	$<80 \text{ pg/mL}$
Noradrenalina	$243.7 \pm 32.3$	$220.3 \pm 35.8$	$<500 \text{ pg/mL}$
Dopamina	$31.0 \pm 6.5$	$30.5 \pm 6.3$	$<100 \text{ pg/mL}$
Cortisolo	$116.5 \pm 9.5$	$138.7 \pm 9.1$	$72-308 \text{ ng/mL}$
ACTH	$15.2 \pm 2.1$	$17.4 \pm 1.9$	$9-52 \text{ pg/mL}$

**Tab.1:** Nella tabella sono riportati i valori medi ( $\pm$ SEM) dei livelli sierici degli ormoni valutati nel gruppo dei SHYPO e nel gruppo dei Controlli.  $***p<.0001$

## 2) Funzioni neuropsicologiche ed emotive

L'analisi delle funzioni neuropsicologiche è stata effettuata considerando 3 funzioni cognitive principali (Fluenza verbale, Intelligenza fluida e Memoria) e 4 funzioni emotive principali (Umore, Ansia di stato, di tratto e somatica).

Il confronto tra gruppi non ha messo in evidenza alcuna differenza per le funzioni cognitive. Per quanto riguarda invece le funzioni emotive i soggetti SHYPO hanno presentato livelli di ansia di tratto ( $F(1,16)= 5.488$ ;  $p<.05$ ) e di stato ( $F(1,16)= 6.369$ ;  $p<.05$ ) significativamente superiori a quelli dei controlli mentre non hanno differito dai controlli per l'umore e l'ansia somatica (tabella 2). (Per i risultati dettagliati si rimanda all'APPENDICE VII).

Funzioni	Sotto-funzioni	SHYPO	Controlli
Cognitive	Fluenza verbale	58,6±5.5	54,7±2.9
	Intelligenza fluida	237,9±11.6	234,4±7.1
	Memoria	69,7±3.1	69,2±1.6
Emotive	Umore	117,4±8.9	107,3±4.4
	Ansia somatica	168,6±11.6	145,9±6.2
	Ansia stato	<b>162,1±8.1*</b>	139,1±4.1
	Ansia tratto	<b>219,7±8.2*</b>	196,0±6.0

**Tab.2:** Nella tabella sono riportati i valori medi (+SEM) della valutazione neuropsicologica delle funzioni cognitive e emotive nel il gruppo dei Controlli e nel gruppo SHYPO. I soggetti SHYPO presentano livelli significativamente più elevati di ansia di stato e tratto rispetto ai controlli. \* $p<.05$

## 3) Variabili neurovegetative (basale)

### Frequenza cardiaca (FC)

I due gruppi sperimentali non presentano differenze significative (Tab. 3)

### Frequenza respiratoria (FR)

I due gruppi sperimentali non presentano differenze significative (Tab. 3)

### Indici spettrali di variabilità cardiaca

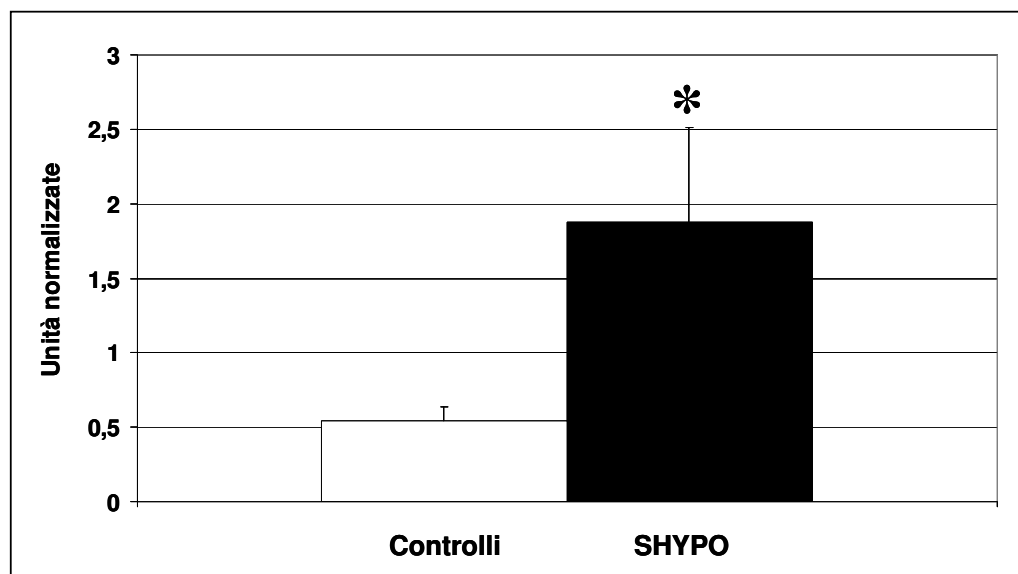
I due gruppi sperimentali non presentano differenze significative per i valori normalizzati delle LF (Tab. 3) e delle HF (Tab. 3) mentre sono stati osservati valori di rapporto LF/HF significativamente superiori nei soggetti SHYPO rispetto ai controlli ( $F(1,16)= 4.307$ ,  $p<.05$ ) (Fig. 2)

### Resistenza cutanea (oscillazioni spontanee - RC)

I due gruppi sperimentali non presentano differenze significative (Tab. 3)

parametri	SHYPO	Controlli	Unità di misura
FC	71.6±3.1	70.9±3.1	Batt/min
FR	17.9±0.6	17.7±0.9	Resp/min
HF	47.1±7.3	60.1±3.9	U.n.
LF	52.8±7.3	39.9±3.9	U.n
RC	0.11±0.02	0.07±0.03	Hz

**Tab.3:** Nella tabella sono riportati i valori medi (+SEM) della Frequenza cardiaca (FC) e respiratoria (FR), degli indici spettrali del segnale di variabilità cardiaca (HF e LF) e delle oscillazioni spontanee della resistenza cutanea (RC) nel gruppo SHYPO e nel gruppo dei controlli in condizione basale.



**Fig 2 rapporto LF/HF**

Nel grafico sono riportati i valori medi ( $\pm$ SEM) in condizione basale per il gruppo dei Controlli ( $\square$ ) e per il gruppo SHYPO ( $\blacksquare$ ). Il gruppo SHYPO presenta un rapporto LF/HF significativamente superiore a quello dei controlli \* $p < .05$

### **4) Variabili comportamentali (basale)**

#### **1) Attività gamma**

I due gruppi sperimentali non presentano differenze significative (Tab. 4)

#### **2) Attività beta**

I due gruppi sperimentali non presentano differenze significative né per beta2 (Tab. 4) che per beta1 (Tab. 4)

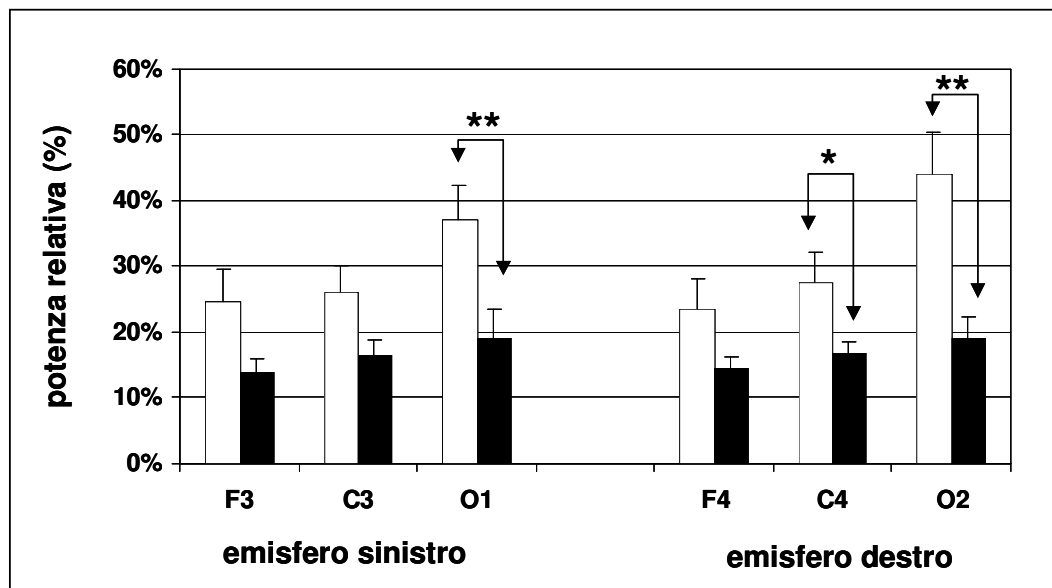
### 3) Attività alfa

Per quanto attiene l'attività alfa2 (Fig. 3), l'ANOVA multivariata ha messo in evidenza una interazione significativa GruppoXElettrodo ( $F(5,80)=5.654$ ,  $p<.001$ ). In particolare, il gruppo C presenta valori di alfa2 significativamente superiori rispetto al gruppo SHYPO in O1 ( $F(1,16)=6.971$ ,  $p<.01$ ), in C4 ( $F(1,16)=4.912$ ,  $p<.05$ ) e in O2 ( $F(1,16)=12.897$ ,  $p<.01$ ).

I due gruppi sperimentali non presentano invece differenze significative per alfa1 (Tab. 4)

### 4) Attività teta

I due gruppi sperimentali non presentano differenze significative sia per teta2 (Tab. 4) che per teta1 (Tab. 4)



**Fig. 3 Attività Alfa2**

Nel grafico sono riportati i valori medi ( $\pm$ SEM) in condizione basale per il gruppo dei Controlli (□) e per il gruppo SHYPO (■). Il gruppo dei controlli presenta una potenza relativa Alfa2 significativamente superiore a quello degli SHYPO bilateralmente nelle regioni occipitali e centrale destra. \* $p<.05$ ; \*\* $p<.01$

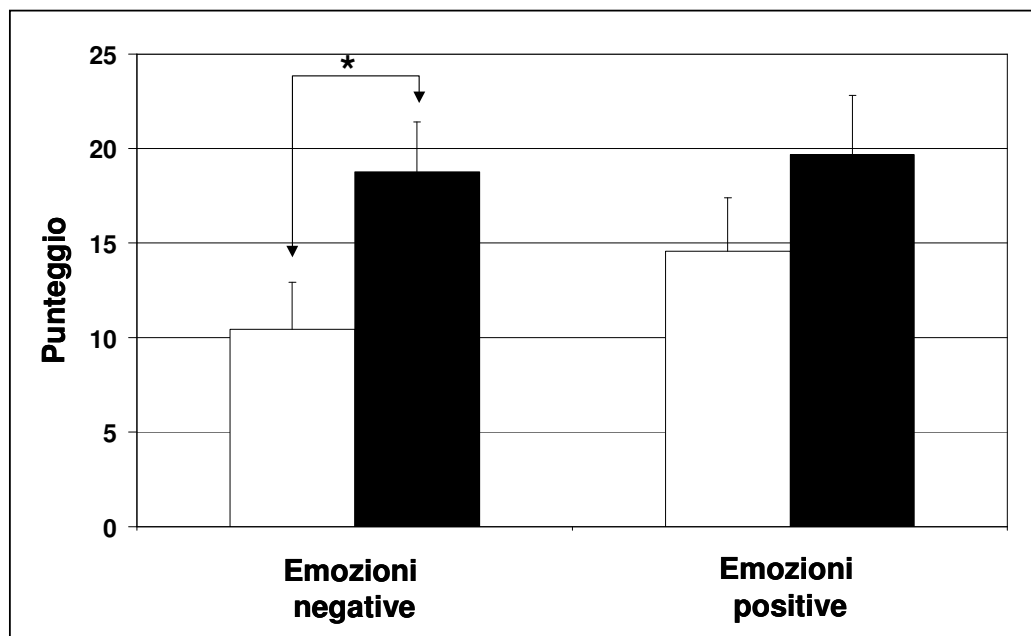
Attività EEG	Elettrodi	SHYPO	Controlli
<b>Gamma</b>	F3	3.0±0.9	2.0±0.4
	F4	2.9±0.9	1.9±0.4
	C3	2.2±0.7	1.6±0.4
	C4	2.5±0.3	1.9±0.3
	O1	2.7±0.6	2.1±0.6
	O2	2.2±0.5	1.4±0.3
<b>Beta2</b>	F3	16.2±2.5	19.5±3.4
	F4	15.4±1.5	18.1±2.8
	C3	17.2±3.4	19.2±3.7
	C4	14.2±0.8	14.2±1.2
	O1	16.2±3.4	16.7±3.1
	O2	14.7±2.4	11.4±1.4
<b>Beta1</b>	F3	17.2±1.2	14.1±1.4
	F4	17.2±1.3	14.8±1.4
	C3	18.7±1.5	14.1±1.2
	C4	18.6±1.4	13.8±0.9
	O1	18.3±2.4	14.9±2.0
	O2	19.0±3.0	15.1±2.9
<b>Alfa1</b>	F3	15.3±2.1	17.1±2.2
	F4	19.6±3.1	17.7±2.2
	C3	19.6±3.3	21.5±3.3
	C4	20.4±3.0	21.2±3.3
	O1	21.6±5.9	18.9±3.3
	O2	22.5±6.2	20.5±3.9
<b>Teta2</b>	F3	18.4±3.1	13.1±1.1
	F4	18.6±2.8	12.8±1.1
	C3	16.9±2.8	11.6±1.0
	C4	16.6±2.6	11.7±1.0
	O1	11.5±1.8	6.9±0.9
	O2	12.4±1.6	6.9±1.0
<b>Teta1</b>	F3	14.7±1.9	16.6±3.0
	F4	15.4±2.4	16.5±2.9
	C3	12.6±1.6	14.0±2.7
	C4	12.3±1.3	13.7±2.6
	O1	9.0±1.9	9.0±2.3
	O2	9.9±2.1	9.1±2.2

**Tab.4:** Nella tabella sono riportati i valori medi percentuali ( $\pm$ SEM) delle potenze spettrali dei ritmi EEG Gamma, Beta2, Beta1, Alfa1, Teta2 e Teta1 nel gruppo SHYPO e nel gruppo dei controlli in condizione basale

## B2) CONDIZIONE DI STIMOLAZIONE

### Questionario di autovalutazione emotiva

Alla fine di ogni sessione di registrazione, la scala strutturata per valutare il vissuto di ogni soggetto durante l'esperimento ha messo in luce che tutti i soggetti, sia SHYPO che di controllo, hanno provato un'emozione positiva durante la visione del video a contenuto piacevole ed un'emozione negativa durante la presentazione del video a contenuto emotivo avversivo. Il confronto tra i gruppi ha messo in evidenza che i soggetti SHYPO hanno provato una emozione negativa totale significativamente superiore a quella dei controlli ( $F(1,16)=5.401$ ;  $p<.05$ ), mentre non si apprezzano differenze per quanto riguarda le emozioni positive (Fig. 4).



**Fig. 4 Questionari di auto-valutazione**

Nel grafico sono riportati i valori medi ( $\pm$ SEM) durante le condizioni di stimolazione per il gruppo dei Controlli (□) e per il gruppo SHYPO (■). Il punteggio delle emozioni negative riguarda il vissuto durante il film a contenuto avversivo mentre quello delle emozioni positive il vissuto durante il film piacevole. \* $p<.05$

## Variabili neurovegetative

### Frequenza cardiaca (FC)

I due gruppi sperimentali non presentano differenze significative (Tab. 5)

### Frequenza respiratoria (FR)

I due gruppi sperimentali non presentano differenze significative (Tab. 5)

parametri	Stimoli	SHYPO	Controlli
FC	VN	72.8±2.8	70.5±3.6
	VP	74.9±3.4	70.3±3.9
	VA	76.2±4.0	70.7±3.8
FR	VN	18.4±0.4	19.7±0.9
	VP	20.4±0.9	21.1±1.0
	VA	19.7±1.2	19.0±0.7

**Tab.5:** Nella tabella sono riportati i valori medi ( $\pm$ SEM) della Frequenza cardiaca (FC, batt/min) e respiratoria (FR, resp/min), nel gruppo SHYPO e nel gruppo dei controlli in condizione di stimolazione. VN= Video Neutro; VP= Video Piacevole; VA= Video Avversivo

### Indici spettrali di variabilità cardiaca

#### **LF:**

L'ANOVA per misure ripetute ha messo in evidenza un effetto Condizione ( $F(2,32)= 5.400$ ;  $p<.01$ ) ed una interazione GruppoXCondizione ( $F(2,32)= 4.970$ ;  $p<.05$ ). Il confronto tra gruppi (Fig. 5) mostra che durante VA i soggetti SHYPO presentano valori di LF significativamente più elevati dei controlli ( $F(1,16)= 25.308$ ;  $p<.001$ ). L'ANOVA per misure ripetute effettuata all'interno di ciascun gruppo, mentre non mostra alcun effetto all'interno dei soggetti SHYPO, indica nel gruppo dei controlli un effetto Condizione ( $F(2,16)=7.931$ ;  $p<.01$ ). L'analisi dei contrasti ha mostrato che VA presenta valori di LF significativamente inferiori a VN ( $F(1,8)= 7.759$ ;  $p<.05$ ) e a VP ( $F(1,8)= 13.291$ ;  $p<.01$ ).

#### **HF:**

L'ANOVA per misure ripetute ha messo in evidenza un effetto Condizione ( $F(2,32)= 5.400$ ;  $p<.01$ ) ed una interazione GruppoXCondizione ( $F(2,32)= 4.970$ ;  $p<.05$ ). Il confronto tra gruppi (Fig. 6) mostra che durante VA i soggetti di controllo presentano valori di HF significativamente più elevati degli SHYPO ( $F(1,16)= 8.433$ ;  $p<.01$ ). L'ANOVA per misure ripetute effettuata all'interno di ciascun gruppo, mentre non mostra alcun effetto all'interno dei soggetti SHYPO, indica nel gruppo dei controlli un effetto Condizione ( $F(2,16)=6.921$ ;



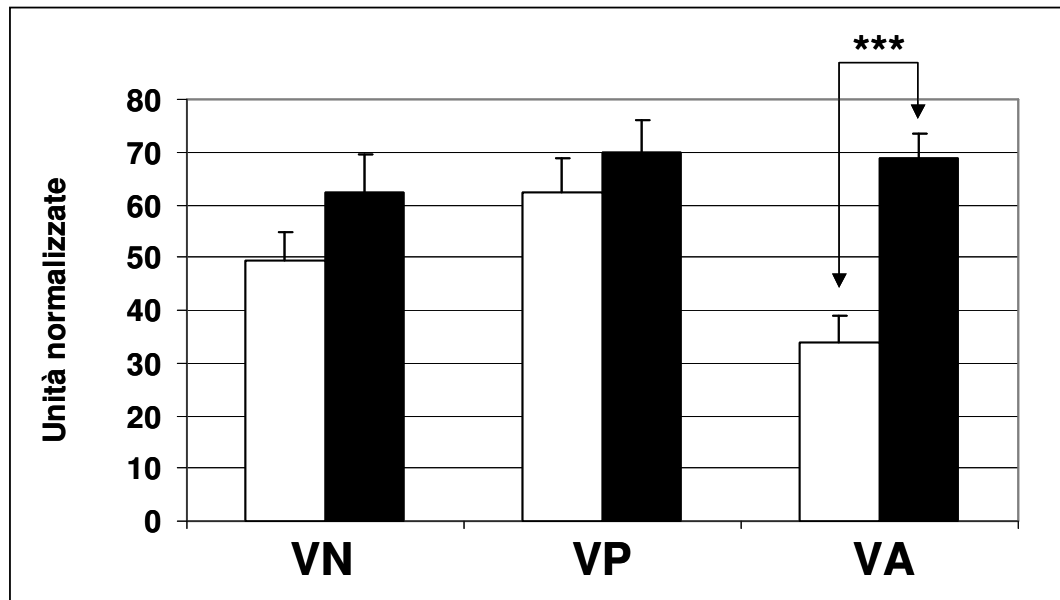
$p < .01$ ). L'analisi dei contrasti ha mostrato che VA produce valori di HF significativamente superiori a VN ( $F(1,8) = 7.759$ ;  $p < .05$ ) e a VP ( $F(1,8) = 13.291$ ;  $p < .01$ ).

#### **Rapporto LF/HF:**

L'ANOVA per misure ripetute ha messo in evidenza un effetto Condizione ( $F(2,32) = 6.400$ ;  $p < .01$ ) ed una interazione GruppoXCondizione ( $F(2,32) = 4.620$ ;  $p < .05$ ). Il confronto tra gruppi (Fig. 7) mostra che durante VA i soggetti SHYPO presentano un rapporto LF/HF significativamente più elevato dei controlli ( $F(1,16) = 18.043$ ;  $p < .001$ ).

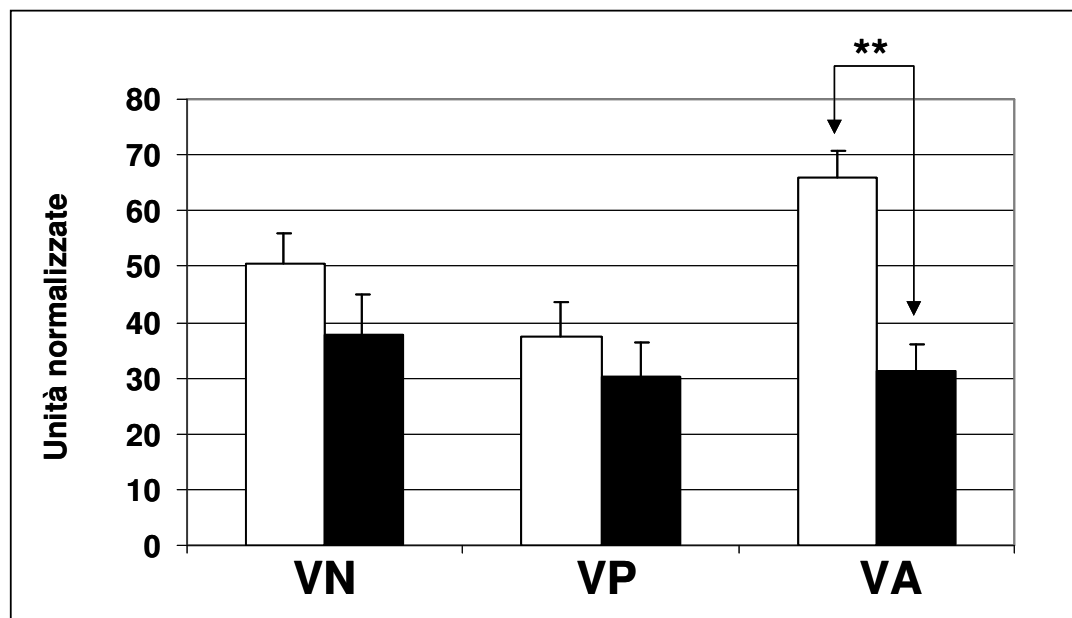
#### **Resistenza cutanea (oscillazioni spontanee)**

L'ANOVA per misure ripetute ha messo in evidenza un effetto Condizione ( $F(2,32) = 18.941$ ;  $p < .001$ ) ed una interazione GruppoXCondizione ( $F(2,32) = 10.437$ ;  $p < .001$ ). Il confronto tra gruppi (Fig. 8) mostra che durante VA i soggetti SHYPO presentano valori di oscillazioni spontanee significativamente più elevati dei controlli ( $F(1,16) = 43.026$ ;  $p < .001$ ). L'ANOVA per misure ripetute effettuata all'interno di ciascun gruppo, indica che in entrambi i gruppi sperimentali è presente un effetto condizione: nell'ambito del gruppo SHYPO ( $F(2,16) = 11.791$ ;  $p < .001$ ), il confronto tra i video indica che in VN il numero di oscillazioni spontanee è significativamente inferiore rispetto a VP ( $F(1,8) = 15.444$ ;  $p < .001$ ) e a VA ( $F(1,8) = 20.965$ ;  $p < .01$ ) mentre VA e VP non sono significativamente differenti tra loro. Nel gruppo dei controlli ( $F(2,16) = 24.558$ ;  $p < .001$ ) il confronto tra i video indica invece che in VP il numero di oscillazioni spontanee è significativamente superiore rispetto a VN ( $F(1,8) = 25.293$ ;  $p < .001$ ) e a VA ( $F(1,8) = 36.894$ ;  $p < .001$ ) mentre VA e VN non sono significativamente differenti tra loro.



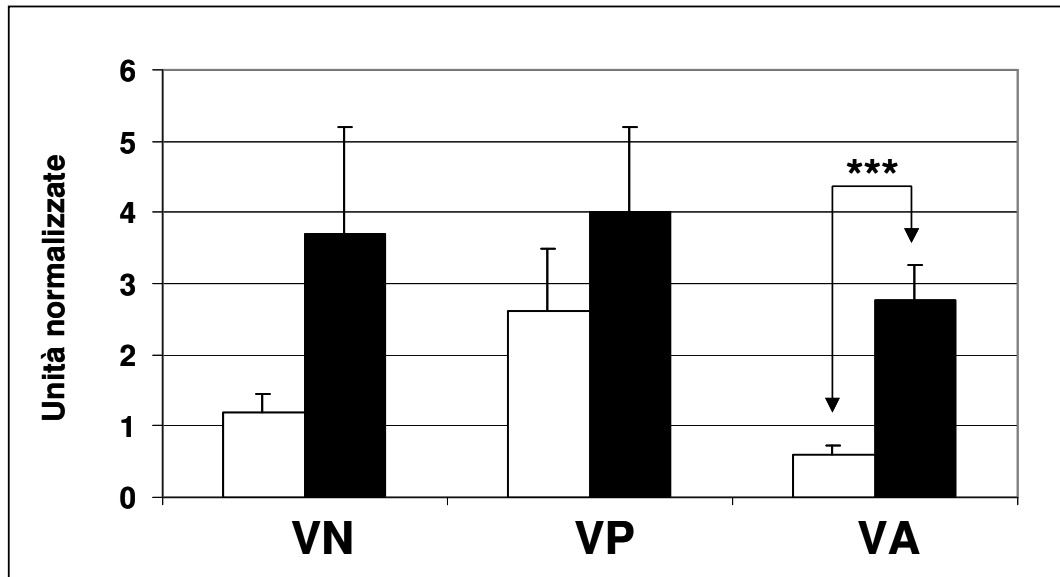
**Fig. 5 LF**

Nel grafico sono riportati i valori medi ( $\pm$ SEM) durante le condizioni di stimolazione per il gruppo dei Controlli (□) e per il gruppo SHYPO (■). VN= video neutro; VP= video piacevole; VA= video avversivo. \*\*\* $p < .001$



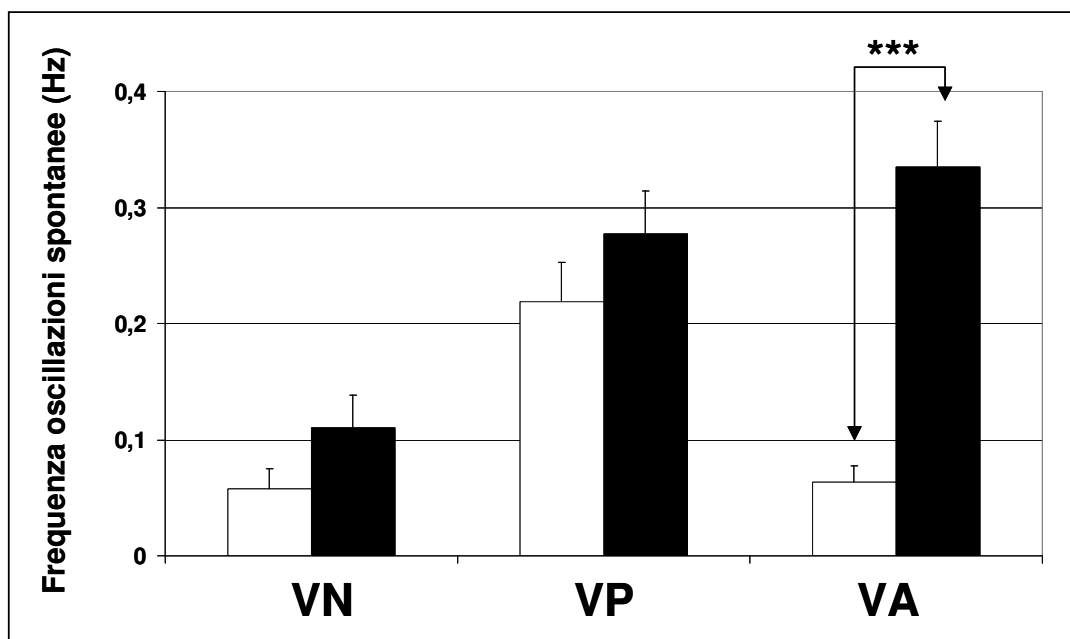
**Fig. 6 HF**

Nel grafico sono riportati i valori medi ( $\pm$ SEM) durante le condizioni di stimolazione per il gruppo dei Controlli (□) e per il gruppo SHYPO (■). VN= video neutro; VP= video piacevole; VA= video avversivo. \*\* $p < .01$



**Fig. 7 rapporto LF/HF**

Nel grafico sono riportati i valori medi ( $\pm$ SEM) durante le condizioni di stimolazione per il gruppo dei Controlli (□) e per il gruppo SHYPO (■). VN= video neutro; VP= video piacevole; VA= video avversivo. \*\*\* $p < .001$



**Fig 8 Resistenza cutanea (oscillazioni spontanee)**

Nel grafico sono riportati i valori medi ( $\pm$ SEM) durante le condizioni di stimolazione per il gruppo dei Controlli (□) e per il gruppo SHYPO (■). VN= video neutro; VP= video piacevole; VA= video avversivo. \*\*\* $p < .001$ .

## **Variabili comportamentali**

### **1) Attività gamma**

L'ANOVA per misure ripetute ha messo in evidenza un effetto Condizione ( $F(2,32)= 3.329$ ;  $p<.05$ ) ed una interazione GruppoXCondizione ( $F(2,32)= 3.553$ ;  $p<.05$ ). Il confronto tra gruppi (Fig. 9) mostra che durante VP ( $F(1,16)= 23.026$ ;  $p<.01$ ) e VA ( $F(1,16)= 9.163$ ;  $p<.05$ ) i soggetti SHYPO presentano valori di attività gamma significativamente più elevati dei controlli. L'ANOVA per misure ripetute effettuata all'interno di ciascun gruppo indica che solamente nel gruppo SHYPO è presente un effetto condizione ( $F(2,16)= 13.495$ ;  $p<.001$ ), il confronto tra i video indica che VP presenta livelli di attività gamma significativamente superiori rispetto a VN ( $F(1,8)= 14.885$ ;  $p<.01$ ) e a VA ( $F(1,8)= 13.393$ ;  $p<.01$ ) mentre VA e VN non sono significativamente differenti tra loro.

### **2) Attività beta**

- Beta2: l'ANOVA per misure ripetute ha messo in evidenza una interazione GruppoXCondizione ( $F(2,32)= 5.440$ ;  $p<.01$ ). Il confronto tra gruppi (Fig. 10) mostra che solamente durante VP ( $F(1,16)= 22.116$ ;  $p<.01$ ) i soggetti SHYPO presentano valori di attività beta2 significativamente più elevati dei controlli. L'ANOVA per misure ripetute effettuata all'interno di ciascun gruppo indica che solamente nel gruppo SHYPO è presente un effetto condizione ( $F(2,16)= 8.017$ ;  $p<.01$ ). Analogamente a quanto osservato per l'attività gamma, il confronto tra i video indica che VP presenta livelli di attività beta2 significativamente superiori rispetto a VN ( $F(1,8)= 15.781$ ;  $p<.01$ ) e a VA ( $F(1,8)= 15.373$ ;  $p<.01$ ) mentre VA e VN non sono significativamente differenti tra loro.
- Beta1: I due gruppi sperimentali non presentano differenze significative (Fig. 11).

### **3) Attività alfa**

- Alfa2: l'ANOVA per misure ripetute non ha messo in evidenza alcun effetto significativo. La stessa analisi effettuata invece all'interno di ciascun gruppo indica che solamente nel gruppo SHYPO è presente un effetto Condizione ( $F(2,16)= 5.168$ ;  $p<.01$ ), il confronto tra i video indica che VP presenta livelli

di attività alfa2 significativamente inferiori rispetto a VN ( $F(1,8)= 3.570$ ;  $p<.05$ ) e a VA ( $F(1,8)= 3.643$ ;  $p<.05$ ) mentre VA e VN non sono significativamente differenti tra loro (Fig. 12).

- Alfa1: l'ANOVA per misure ripetute ha messo in evidenza una interazione GruppoXCondizione ( $F(2,32)= 5.157$ ;  $p<.05$ ). Il confronto tra gruppi (Fig. 13) mostra che solamente durante VP ( $F(1,16)= 12.016$ ;  $p<.01$ ) i soggetti di controllo presentano valori di attività alfa1 significativamente più elevati degli SHYPO. L'ANOVA per misure ripetute effettuata all'interno di ciascun gruppo indica che solamente nel gruppo SHYPO è presente un effetto condizione ( $F(2,16)= 9.060$ ;  $p<.01$ ), il confronto tra i video indica che VP presenta livelli di attività alfa1 significativamente inferiori rispetto a VN ( $F(1,8)= 9.366$ ;  $p<.05$ ) e a VA ( $F(1,8)= 12.316$ ;  $p<.01$ ) mentre VA e VN non sono significativamente differenti tra loro.

#### 4) **Attività teta**

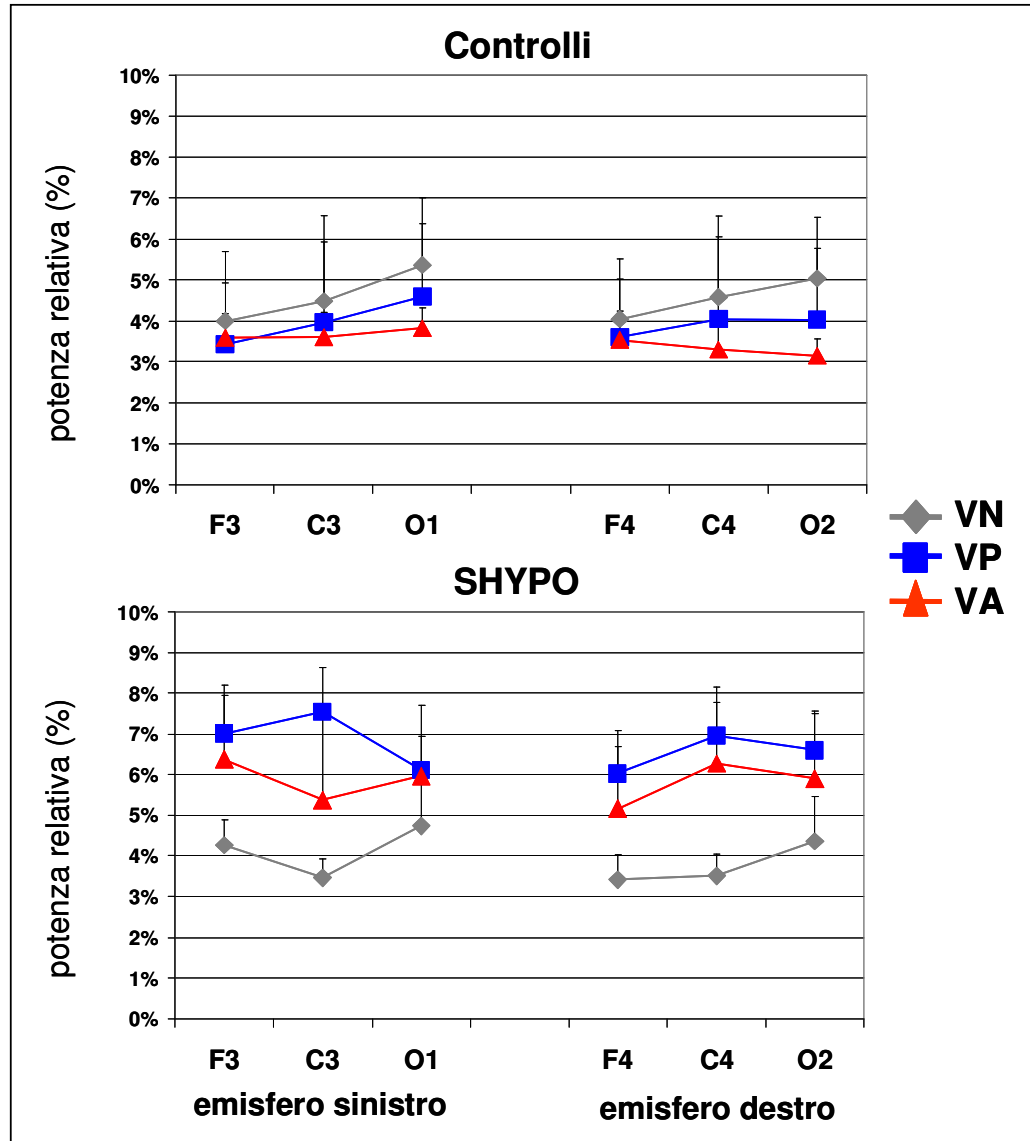
I due gruppi sperimentali non presentano differenze significative per teta2 (Fig. 14) e per teta1 (Fig. 15)

#### 5) **Blink oculare**

I due gruppi sperimentali non presentano differenze significative (Tab. 6)

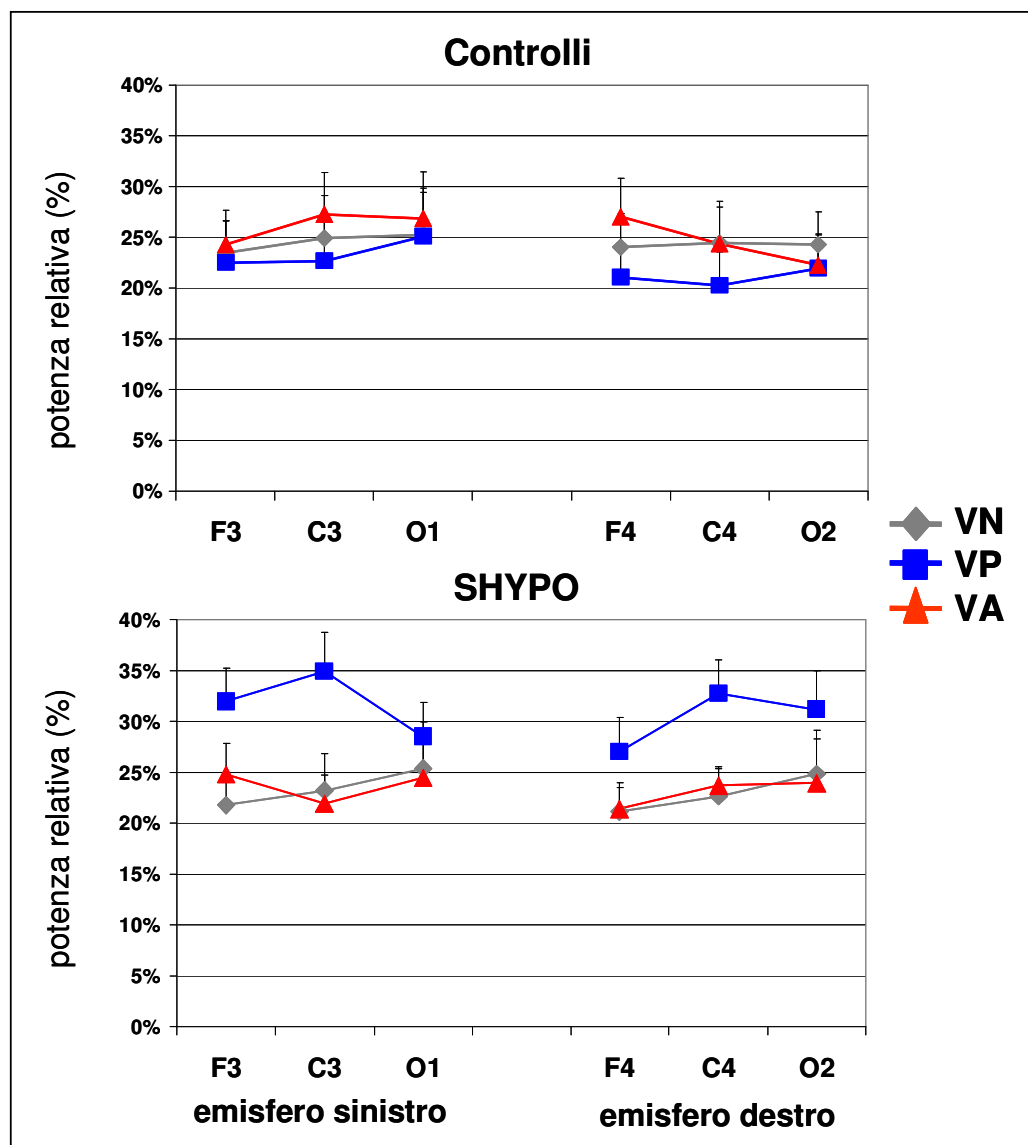
parametri	Stimoli	SHYPO	Controlli
Blink	VN	1.1 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.08
	VP	1.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.09
	VA	1.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1

**Tab.6:** Nella tabella sono riportati i valori medi ( $\pm$ SEM) dell'ammiccamento (Blink) nel gruppo SHYPO e nel gruppo dei controlli in condizione di stimolazione. VN= Video Neutro; VP= Video Piacevole; VA= Video Avversivo



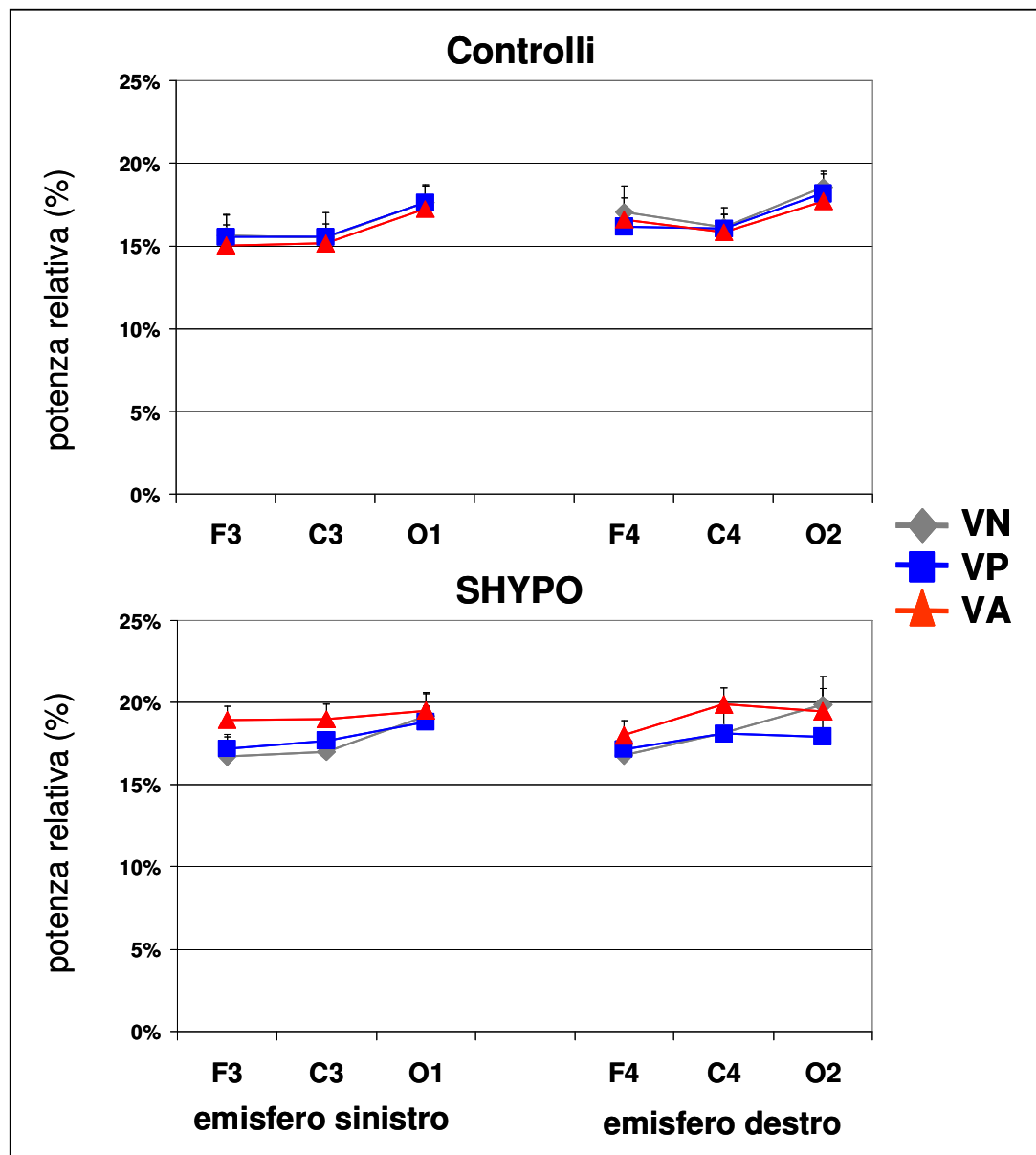
**Fig. 9 Attività Gamma**

Nel grafico sono riportati i valori medi ( $\pm$ SEM) durante le condizioni di stimolazione per il gruppo dei Controlli (in alto) e per il gruppo SHYPO (in basso). VN= video neutro; VP= video piacevole; VA= video avversivo. SHYPO > Controlli durante VP ( $p < .01$ ) e VA ( $p < .05$ ). Per ulteriori dettagli statistici si rimanda al testo.



**Fig. 10 Attività Beta2**

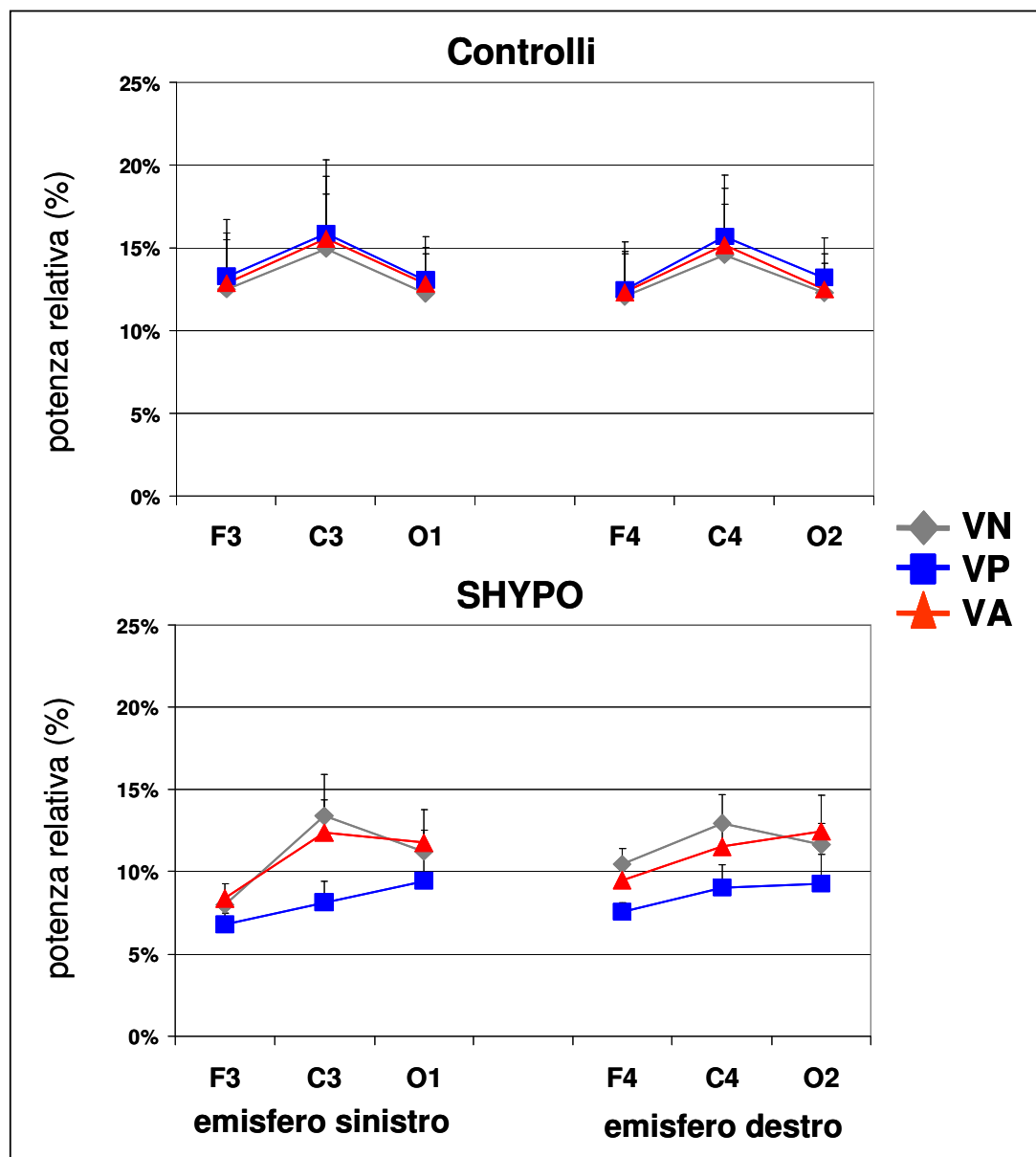
Nel grafico sono riportati i valori medi ( $\pm$ SEM) durante le condizioni di stimolazione per il gruppo dei Controlli (in alto) e per il gruppo SHYPO (in basso). VN= video neutro; VP= video piacevole; VA= video avversivo. SHYPO > Controlli durante VP ( $p < .01$ ). Per ulteriori dettagli statistici si rimanda al testo.



**Fig. 11 Attività Beta1**

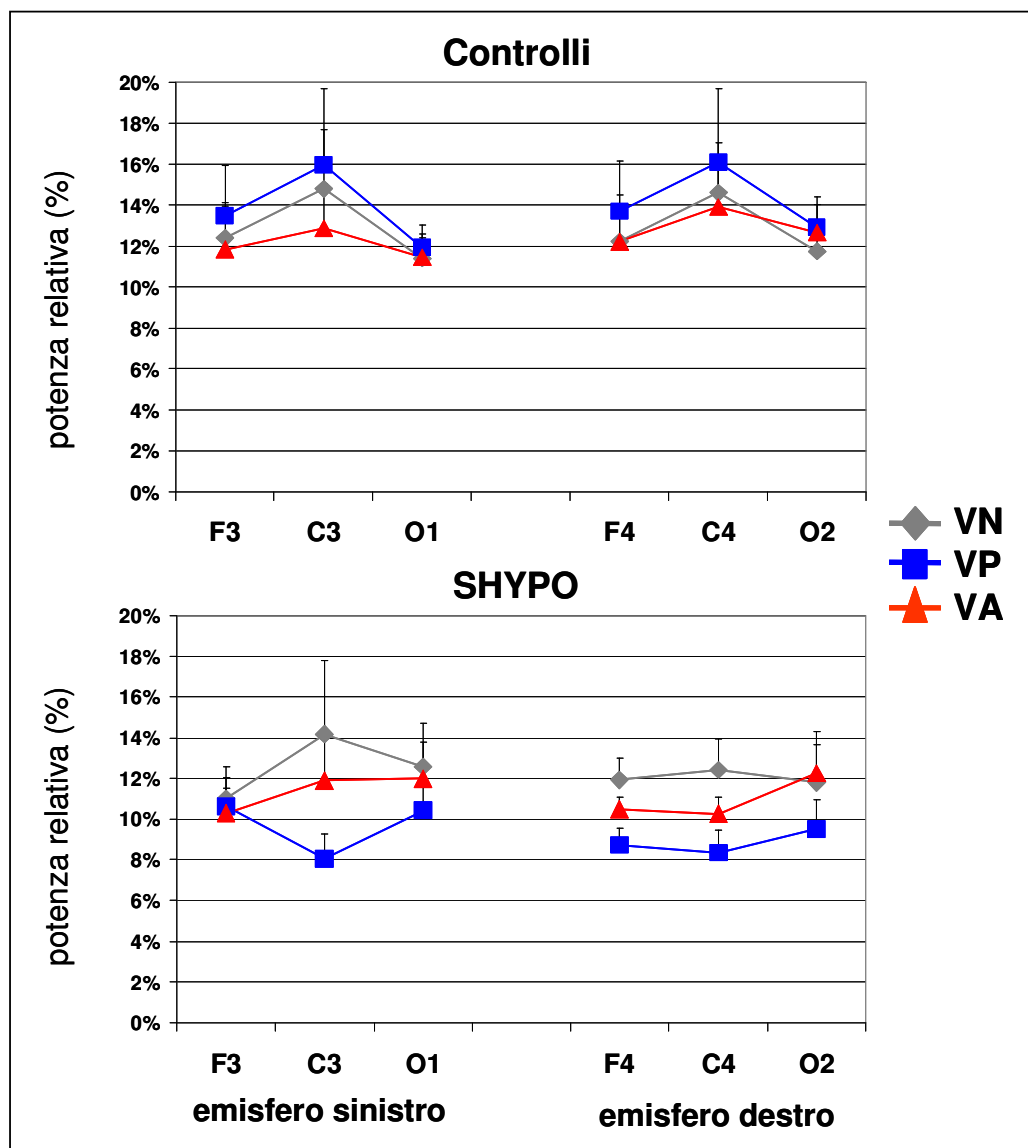
Nel grafico sono riportati i valori medi ( $\pm$ SEM) durante le condizioni di stimolazione per il gruppo dei Controlli (in alto) e per il gruppo SHYPO (in basso). VN= video neutro; VP= video piacevole; VA= video avversivo.





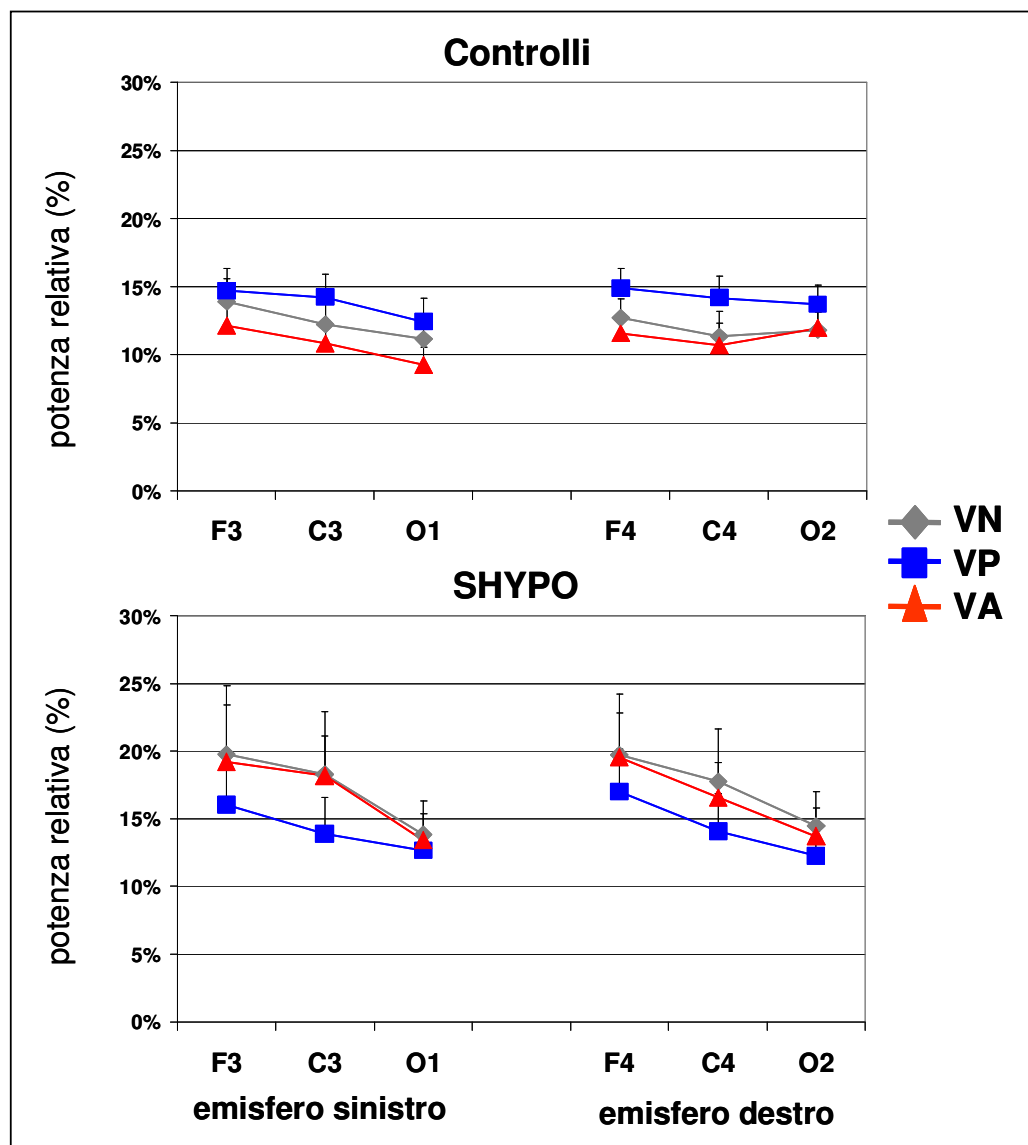
**Fig. 12 Attività Alfa2**

Nel grafico sono riportati i valori medi ( $\pm$ SEM) durante le condizioni di stimolazione per il gruppo dei Controlli (in alto) e per il gruppo SHYPO (in basso). VN= video neutro; VP= video piacevole; VA= video avversivo. Per ulteriori dettagli statistici si rimanda al testo



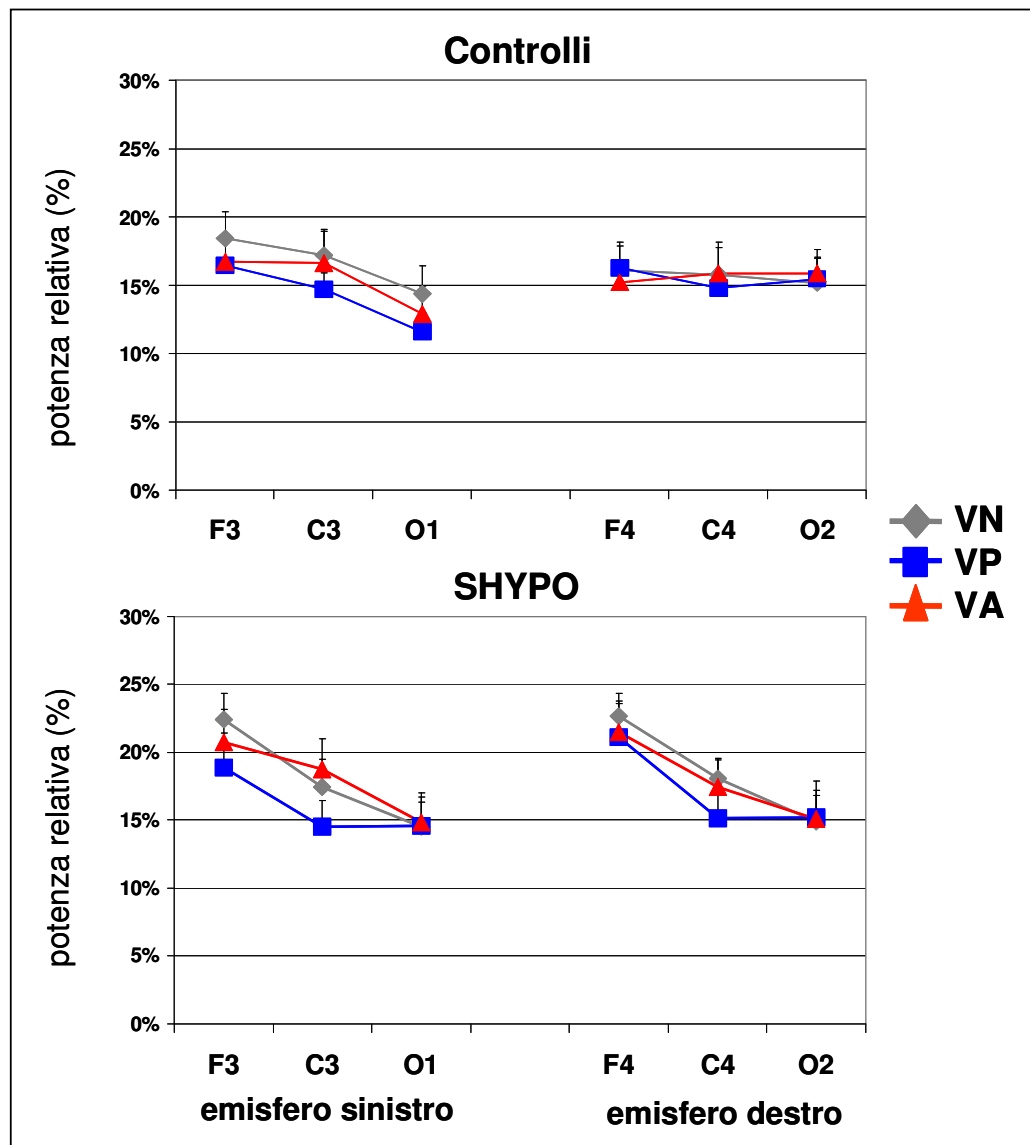
**Fig. 13 Attività Alfa1**

Nel grafico sono riportati i valori medi ( $\pm$ SEM) durante le condizioni di stimolazione per il gruppo dei Controlli (in alto) e per il gruppo SHYPO (in basso). VN= video neutro; VP= video piacevole; VA= video avversivo. Controlli > SHYPO durante VP ( $p < .01$ ). Per ulteriori dettagli statistici si rimanda al testo



**Fig. 14 Attività Teta2**

Nel grafico sono riportati i valori medi ( $\pm$ SEM) durante le condizioni di stimolazione per il gruppo dei Controlli (in alto) e per il gruppo SHYPO (in basso). VN= video neutro; VP= video piacevole; VA= video avversivo.



**Fig. 15 Attività Teta1**

Nel grafico sono riportati i valori medi ( $\pm$ SEM) durante le condizioni di stimolazione per il gruppo dei Controlli (in alto) e per il gruppo SHYPO (in basso). VN= video neutro; VP= video piacevole; VA= video avversivo.

## DISCUSSIONE DEI RISULTATI

I risultati indicano che tutti i soggetti normali e tutti i soggetti con ipotiroidismo subclinico (SHYPO) hanno provato un'intensa emozione positiva e negativa, rispettivamente durante la stimolazione piacevole e quella avversiva, che si associavano a marcate modificazioni dell'attività neurovegetativa ed elettroencefalografica.

L'uso della stimolazione audio-visiva si è dimostrato uno strumento cognitivo/emotivo adeguato per evocare risposte emotive sia di natura piacevole che avversiva (vedi APPENDICA III).

Come era lecito attendersi, la condizione di ipotiroidismo subclinico non rappresenta un requisito fondamentale per evocare una reazione affettiva, anche se il gruppo SHYPO ha presentato, rispetto ai controlli e soprattutto in risposta alla stimolazione avversiva, modificazioni più marcate delle variabili neurovegetative ed elettroencefalografiche.

Tenendo in considerazione le caratteristiche del campione e del disegno sperimentale è stato possibile indagare:

1. i *pattern* neurovegetativi e comportamentali in condizioni basali, cioè in assenza di qualsiasi stimolazione (tratto)
2. le modificazioni neurovegetative e comportamentali a seguito delle differenti condizioni di attivazione, cioè durante il video a contenuto emotivo neutro, piacevole e spiacevole (stato).

Il confronto in condizioni di minima stimolazione sensoriale (condizione basale ad occhi chiusi e assenza di qualsiasi rumore) ha messo in evidenza che i soggetti SHYPO differiscono dai controlli solamente per due variabili neurovegetative e comportamentali: il rapporto LF/HF e il ritmo EEG alfa2.

I valori più elevati del rapporto LF/HF osservati nei soggetti SHYPO associati a più bassi livelli di potenza relativa alfa2, indicano che in questo gruppo sperimentale già basalmente è presente uno spostamento dell'equilibrio simpato-vagale verso una predominanza simpatica che si lega probabilmente ad un incremento dei livelli di "arousal" corticale. Il dato è in linea con i risultati ottenuti dalla valutazione neuropsicologica che mettono in evidenza come i due gruppi differiscono tra loro solo per i valori di ansia di tratto e di stato (indagata

con EMAS), mentre non si osservano differenze significative per le altre variabili legate alla sfera affettiva, come l'umore e l'ansia somatica, e per tutte le componenti cognitive studiate come la memoria, l'attenzione, la fluenza verbale e l'intelligenza fluida.

Questi risultati non si discostano dalle osservazioni di Monzani et al. (1993) e Gonen et al. (2004), che evidenziano nei soggetti SHYPO livelli d'ansia significativamente più elevati rispetto alle popolazioni di controllo. Per quanto attiene l'umore, i dati della letteratura sono alquanto discordanti; alcuni studi hanno riscontrato nell'ipotiroidismo subclinico una maggiore incidenza di umore depresso (Haggerty et al., 1992; Vandoolaeghe et al., 1997) mentre altri non hanno osservato alcuna modificazione dell'assetto affettivo (Baldini et al., 1997; Engum et al., 2002). Questi studi comunque hanno utilizzato strumenti psicometrici tipicamente clinici come la Scala di Hamilton per l'Ansia o per la Depressione e la Beck's Anxiety Inventory (BAI), i cui risultati sono difficilmente confrontabili da quelli ottenuti nel presente lavoro di tesi; l'approccio che abbiamo utilizzato è infatti di tipo puramente psicologico e non clinico e le scale di valutazione sono di tipo multidimensionale. Il nostro studio, inoltre, prevedeva tra i criteri di inclusione una valutazione psichiatrica preliminare che non ha rilevato alcuna diagnosi di Asse I per disturbi dell'umore o d'ansia (DSM-IV-R, 2000). Inoltre, la valutazione ormonale basale non ha mostrato alcuna differenza tra SHYPO e controlli per quanto riguarda gli ormoni associati allo stress quali l'adrenalina, la noradrenalina e l'ACTH e il cortisolo, i cui livelli sierici tipicamente si ritrovano aumentati nei disturbi dell'Umore e d'Ansia (de Kloet, 2003; van Praag, 2004).

Quindi le modificazioni del rapporto LF/HF e del ritmo alfa2 osservate basalmente possono essere interpretate alla luce degli effetti autonomici e comportamentali legati all'incremento di TSH.

Per quanto riguarda le funzioni cognitive, i nostri risultati non sono in linea con quanto presente in letteratura in cui alcuni autori hanno riscontrato alterazioni della memoria (Haggerty et al., 1990; Monzani et al., 1993; Baldini e Vita, 1997) e dell'attenzione (Haggerty et al., 1990; Monzani et al., 1993). Anche in questo caso il nostro approccio è stato molto più complesso, in quanto gli studi presenti in letteratura si sono limitati all'uso della Wechsler Memory Scale mentre la nostra valutazione neuropsicologica è stata effettuata mediante un numero

maggiore di scale. Ciò ci ha permesso di raggruppare le principali funzioni cognitive ed emotive riducendo il numero di falsi positivi legati all'utilizzo di un singolo test psicometrico.

A nostro avviso l'aspetto più importante e originale di questo lavoro rimane comunque la modulazione prodotta dal diverso assetto ormonale delle risposte neurovegetative e comportamentali durante stimolazioni audiovisive con valenza piacevole e avversiva.

Per quanto attiene la frequenza cardiaca e respiratoria, il confronto tra la stimolazione neutra, piacevole e spiacevole ha mostrato che in entrambi i gruppi sperimentali non sono avvenuti cambiamenti significativi. Anche se sono note da tempo le modificazioni della frequenza cardiaca e respiratoria che accompagnano le reazioni emozionali (Rosen e Schulkin, 1998; Palomba et al., 2000), i pochi dati presenti in letteratura riguardanti la presentazione di film sono alquanto discordanti. Lacey et al (1963) hanno osservato decelerazioni di frequenza cardiaca indipendentemente dalla valenza del video, altri autori (Lazarus et al., 1962; Mordkoff, 1964; Steptoe e Vogale, 1986) un suo incremento solamente durante la presentazione di video spiacevoli, mentre Carruthers e Taggart (1973) trovano un incremento di attività simpatica che non si accompagna ad aumenti di frequenza cardiaca.

L'analisi spettrale degli indici di variabilità cardiaca ha mostrato che durante tutte le condizioni di stimolazione i soggetti SHYPO, rispetto ai controlli, presentano livelli maggiori di LF e di rapporto LF/HF e, specularmente, livelli più bassi di HF. Queste differenze sono rilevanti specialmente durante la stimolazione avversiva.

L'aumento del rapporto LF/HF ovviamente può derivare dalla variazione sia delle LF che delle HF; è noto inoltre che nelle LF, che hanno prevalente significato simpatico, è contenuta una componente di probabile origine parasimpatica (Ori et al., 1992) mentre le HF sono un indice di attività parasimpatica (Montano et al., 1994). Dunque nei soggetti con ipotiroidismo subclinico, l'iperattività simpatica potrebbe essere sostenuta sia da un aumento assoluto delle LF che da una riduzione delle HF. Indipendentemente dall'interpretazione, l'incremento di attività simpatica assoluto o relativo rappresenta un aspetto rilevante dei risultati di questa tesi perché permette di correlare un singolo tratto ormonale, cioè incrementi del solo TSH, con una

modificazione di una risposta neurovegetativa specifica legata ad uno stimolo emotivo.

A differenza dei soggetti SHYPO, i soggetti di controllo presentano una risposta spettrale di tipo simpatico solamente durante il video a contenuto emotivo piacevole, il quale ha valenza “arousing” superiore rispetto agli altri. Per cui si può supporre che nell’ipotiroidismo subclinico sia presente una reattività simpatica maggiore e che quindi i soggetti che ne soffrono, in linea con quanto osservato durante la condizione basale, abbiano una minore capacità di autorilassamento che invece caratterizza i soggetti normali. L’assenza di significatività nella risposta spiacevole nel gruppo di controllo può essere attribuita ad una risposta mista simpatica e parasimpatica (Sternbach, 1962; Ekman et al., 1983; Bradley et al., 1993; Palomba e Stegagno, 1993) che potrebbe dipendere da un fenomeno attivo di “distacco” emotivo.

Nei soggetti SHYPO la presenza di uno spostamento globale dell’asse neurovegetativo verso una predominanza simpatica in tutte le condizioni stimolazione e in particolare durante quella avversiva è sostenuto anche dall’incremento della risposta cutanea (RC), calcolato come frequenza di oscillazioni spontanee.

Per quanto attiene la risposta elettrodermica, è possibile utilizzare diversi indici derivanti dall’analisi delle variazioni di resistenza cutanea, associate all’attivazione del sistema simpatico colinergico (Venables and Christie, 1980). Tra i più comuni ricordiamo le misure dell’ampiezza delle oscillazioni (Conduttanza, Resistenza e Potenziale cutaneo), dalla durata (Durata della perturbazione Ohimica, cfr ad es. Collet et al., 1997) o della frequenza (numero di oscillazioni al minuto).

Nel presente lavoro di tesi abbiamo preferito utilizzare la risposta cutanea in termini di frequenza di oscillazioni spontanee, cioè come numero di risposte fasiche nell’unità di tempo, per due motivi principali:

- a) evitare le variazioni fisiologiche dell’ampiezza di questo segnale legate alla metodologia, come riduzione in funzione del tempo delle capacità di conduzione della pasta elettrolitica applicata sugli elettrodi
- b) attenuare i fenomeni di abitudine che normalmente si riscontrano nella presentazione di stimoli di media/lunga durata



La valutazione delle variazioni della resistenza cutanea negli studi sulle emozioni è stata ampiamente utilizzata. Secondo alcuni studi le modificazioni di questo parametro non sono stimolo-specifiche, poiché aumenti generalizzati sono stati osservati associati ad un ampio spettro di contenuti emotivi (Christie & Friedman, 2002), suggerendo che tale variabile sia più strettamente legata all'arousal evocato dallo stimolo che alla valenza dello stesso (Lang et al., 1993; Lane et al., 1997).

Nel nostro studio comunque si può osservare che mentre la risposta cutanea è stimolo dipendente nei soggetti normali, in cui aumenta significativamente solo durante il film piacevole, nei soggetti SHYPO, invece, i suoi incrementi sono linearmente legati non solo all'arousal ma anche alla valenza. In altri termini maggiore è l'arousal e più negativa è la valenza più alta è la risposta elettrodermica.

Questo “profilo di risposta neurovegetativa” è sostenuto anche dai risultati ottenuti dai questionari di auto-valutazione circa il vissuto emotivo provato durante i film. I soggetti SHYPO mostrano infatti punteggi più elevati rispetto ai normali soprattutto per quanto attiene le emozioni negative.

I dati neurovegetativi e quelli di autovalutazione presi nel loro insieme suggeriscono che la più alta reattività dei soggetti SHYPO agli stimoli sia legata ad una certa “rigidità” dell'asse cuore-cervello. In altri termini appare evidente che la condizione ormonale favorisce una risposta, sia in termini di autovalutazione che autonoma, maggiormente orientata verso un vissuto più ansioso e angosciante. Questi risultati sono in linea con alcune evidenze sperimentali, che vedono l'ipotiroidismo subclinico come una condizione di predisposizione se non di innesco per disturbi cardiovascolari (Bengel et al., 2000; Biondi et al., 2005; Tuzcu, 2005) e della sfera affettiva (Monzani et al., 1993; Baldini et al., 1997; Jensovsky et al., 2000; Gonen, 2004).

L'interpretazione dei vari pattern EEG durante le varie condizioni di stimolazione appare notevolmente più complessa di quella delle variabili neurovegetative.

La lettura tradizionale dello spettro EEG in termini funzionali vede le frequenze più rapide e desincronizzate implicate nelle attività cognitive, come l'attenzione, o in quelle emotive, mentre quelle più lente e sincronizzate nel rilassamento fino al sonno profondo. Col progredire degli studi elettroencefalografici e il

miglioramento delle tecniche di esplorazione funzionale *in vivo* del cervello (PET, fMRI) questa finestra interpretativa si è notevolmente ampliata. Ciò ha permesso di assegnare un ruolo alle frequenze più basse nei processi cognitivi e emotivi (Inanaga, 1998; Luu et al., 2004; Basar, 2001) e di individuare l'importanza delle dinamiche di sincronizzazione associate ad espressioni comportamentali specifiche (Basar, 2001; Sauvè, 1999) nell'ottica di una integrazione funzionale tra gruppi neuronali multimodali (von Stein & Sarnthein, 2000).

Nel confronto tra soggetti SHYPO e controlli l'attività gamma e quella beta2 sono quelle che hanno mostrato le variazioni più rilevanti.

L'aumento dell'attività gamma e beta2 che si evidenzia in tutti i soggetti SHYPO rispetto ai controlli durante lo stimolo piacevole cambia il pattern di risposta riscontrato per le variabili neurovegetative, in cui la risposta più importante si osservava durante lo stimolo spiacevole. Durante le condizioni di stimolazione, inoltre, solo il gruppo SHYPO presenta delle risposte stimolo-dipendenti. A differenza dei soggetti di controllo, che presentano una risposta gamma e beta2 omogenea per tutti i tre gli stimoli utilizzati, nei soggetti SHYPO, in particolare per gamma, è stato possibile separare tra di loro le risposte EEG associate alla valenza dello stimolo: maggiori per quello piacevole, intermedie per quello avversivo e minori per quello di controllo neutro.

Questo diverso andamento può essere legato ad una prevalenza dell'effetto dello sforzo nell'elaborazione del compito nei soggetti SHYPO che, a causa di un assetto ormonale "patologico", utilizzano modalità di elaborazione del compito completamente diverse dai soggetti di controllo.

Queste modificazioni del ritmo gamma sono sostenute da quanto riportato in letteratura a proposito della sua relazione con vari processi cognitivi come l'attenzione focalizzata (Pulvermuller et al., 1997; Tiitinen et al., 1993), la memoria (Pantev, 1995; Singer e Gray, 1995), le elaborazioni linguistiche (Pantev, 1995), la percezione (Rodriguez et al., 1999), le emozioni negative (DePascalis, 1998; Gemigani et al., 2000), l'apprendimento associativo (Miltner et al., 1999) e i fenomeni di integrazione dell'attività corticale (Rodriguez et al., 1999).

Come abbiamo già detto, le variazioni osservate per la frequenza beta2 sono qualitativamente simili all'attività gamma e ciò rende difficile attribuire ad esse

un significato specifico. Alcuni studi, infatti, hanno dimostrato che l'attività beta, soprattutto quella più rapida cioè che spettralmente confina con l'attività gamma, gioca un ruolo importante nel preparare la nostra corteccia alla genesi del ritmo gamma. E' riportato inoltre in letteratura che le frequenze beta, in modo particolare quelle più elevate, sembrano essere influenzate dallo stato di attivazione o arousal dell'individuo (Foster & Harrison, 2002; Aftanas & Pavlov, 2005).

Va però notato inoltre che, mentre le variazioni dell'attività gamma sono state associate a variazioni di funzioni cognitive diverse e a reazioni emotive, per l'attività beta sono state descritte più frequentemente variazioni durante compiti motori (McFarland et al., 2000), sia di esecuzione che di preparazione o rappresentazione mentale. I nostri stimoli in realtà non prevedevano risposte motorie da parte dei soggetti, ai quali veniva suggerita l'immobilità, ma non possiamo escludere che l'aumento di attività beta osservato nei soggetti SHYPO sia riferibile ad una intenzione di movimento generato dalla visione dei film.

Per quanto in maniera non così netta, anche i rimanenti ritmi EEG (alfa e teta) hanno mostrato alcune variazioni significative legate al tratto ormonale e alle caratteristiche dello stimolo. In questa fase dello studio, comunque, sono apparsi meno adatti dei due ritmi precedenti per caratterizzare la risposta allo stimolo piacevole e avversivo e perciò la loro discussione si limiterà al confronto delle nostre osservazioni con quanto è noto dalla letteratura sul loro significato fisiologico.

Nei soggetti SHYPO si è osservato un pattern del ritmo alfa1 speculare a quello del gamma. Il problema è che entrambi i ritmi sono stati associati con processi di integrazione tra le aree corticali sia nello svolgimento che nell'intenzione a svolgere un compito o, semplicemente, a prestare attenzione a qualcosa (interna o esterna) (Klimesch et al. 1999; Klimesch, 1996; Shaw, 1996). Quindi è verosimile pensare che nell'ambito del gruppo SHYPO, la condizione ormonale influenzi la connettività funzionale ritmo-dipendente durante stimoli emotivi.

Un altro aspetto importante, che si osserva per alfa1 e alfa2, è che solo i soggetti normali presentano la fisiologica riduzione di questi ritmi nelle regioni

posteriori, legata alla desincronizzazione indotta dall'attivazione della corteccia occipitale dovuta dallo stimolo visivo.

Il ritmo teta non presenta un pattern stimolo-specifico né nei soggetti normali che negli SHYPO. Questo aspetto non è in linea con alcuni risultati della letteratura che ne associano l'aumento all'incremento dei livelli d'ansia (Mizuki et al, 1992).

In letteratura sono riportati numerosi studi che indagano la lateralizzazione emisferiche dell'elaborazione degli stimoli cognitivi o emotivi. I risultati però sono alquanto discordanti. Alcuni ricercatori sostengono che le emozioni positive sarebbero elaborate dall'emisfero sinistro, e viceversa quelle negative dall'emisfero destro (ad es. Jones & Fox, 1992; Wheeler et al., 1993; Lee et al., 2004), in particolare nelle zone frontali (Ahern & Schwartz, 1985, Aftanas et al., 2001). Altri studi propongono modelli basati sulla dimensione emotiva di tipo approccio/ritiro (Davidson et al., 1990; Gray, 2001): emozioni di tipo "approccio" (come gioia, interesse, rabbia) mostrano una asimmetria di attivazione cerebrale a vantaggio sinistro, mentre emozioni di tipo "ritiro" (come paura, disgusto, tristezza) a vantaggio destro. Altri studi, invece, contrastano le teorie di lateralizzazione (Schellberg et al., 1990; Hagemann et al., 1998). Il gruppo di Hagemann, in particolare, osserva (Hagemann et al., 1998) che, a seconda della particolare procedura di analisi delle relazioni tra asimmetria cerebrale anteriore e dimensioni affettive, è possibile ottenere associazioni concordi alla letteratura, opposte o persino inconsistenti.

In questo studio non siamo stati in grado di riscontrare alcuna asimmetria EEG in relazione ai vari stimoli audio-visivi né abbiamo riscontrato differenze significative di lateralizzazione tra i soggetti SHYPO e i controlli. E' necessario tener presente che abbiamo considerato le potenze relative dello spettro EEG, e questo fattore, se da un lato impoverisce la quantità di informazione, dall'altro ci ha permesso di ridurre la variabilità intersoggettiva e quindi di meglio confrontare tra loro i gruppi sperimentali.

Un dato sicuramente interessante che sembra scaturire da questo lavoro di tesi è che nei soggetti SHYPO le risposte corticali e quelle neurovegetative sembrano separarsi all'interno degli stimoli considerati: l'EEG caratterizza meglio le risposte emotive piacevoli mentre i parametri neurovegetativi quelle spiacevoli.

Questo aspetto induce a pensare che un'alterata modulazione ormonale sia in grado di amplificare le risposte emotive sia piacevoli che spiacevoli, suggerendo che i soggetti SHYPO presentino una maggiore suscettibilità verso qualsiasi stimolo emotivo con cui vengono a contatto.

Da un punto di vista prettamente neurormonale, questo aspetto non è così sorprendente. Infatti, è ipotizzabile che l'incremento del TSH nei soggetti SHYPO sia associato a modificazione del suo ormone di controllo, cioè del TRH (vedi appendice). Da un punto di vista fisiologico è stato proposto che il TRH sia alla base di un sistema omeostatico formato da componenti funzionalmente integrate, che agirebbero in maniera coordinata per normalizzare l'intensità e la qualità dell'attività di alcune strutture del sistema nervoso centrale, quali quelle appartenenti al sistema limbico che classicamente generano e modulano le emozioni (Gary e Sevarino, 2003).

## **CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE**

Il modello rappresentato dall'ipotiroidismo subclinico ha consentito di studiare la modulazione ormonale delle risposte cardiovascolari ed elettroencefalografiche associate a stimoli emotivi. Questo modello risulta particolarmente interessante in quanto l'assetto ormonale è caratterizzato solamente dall'incremento dei livelli sierici di TSH.

Questa alterazione, come una "lente di ingrandimento", ha amplificato le risposte neurovegetative e comportamentali modulando le interazioni mente-corpo proprie delle emozioni.

I soggetti SHYPO hanno infatti presentato intense modificazioni cardiovascolari e comportamentali in risposta agli stimoli emotivi, confermando la validità della scelta del "film" come strumento per l'induzione di stati emotivi. Tuttavia l'ipotiroidismo subclinico non ha annullato le differenze tra stimolo piacevole e spiacevole. Le risposte neurovegetative più intense sono infatti state riscontrate durante i film a contenuto emotivo spiacevole mentre quelle comportamentali durante i film a contenuto piacevole. La minor intensità di risposta dei soggetti di controllo soprattutto durante i film avversivi può essere legata alla messa in atto di un comportamento che tende all'evitamento dello stimolo negativo.

Il risultato ottenuto nei soggetti SHYPO assume una particolare rilevanza di ricerca e clinica, poiché questi soggetti che sul piano ormonale differiscono solo

per i loro elevati livelli di TSH, presentano una maggiore vulnerabilità allo sviluppo di patologie cardiovascolari e disturbi psichiatrici, fino a patologie neurodegenerative come la demenza (Haupt e Kurz, 1993; Leentijers e Kappers, 1995; Bauer e Whybrow, 2001).

Questo studio, inoltre, si pone come ricerca pilota in cui un approccio psicofisiologico multiparametrico (stimolazione mediante strumenti audio-visivi, registrazione integrata di variabili neuropsicologiche, autonome e comportamentali) viene affiancato all'approccio clinico. L'importanza di questa integrazione tra ricerca di base e clinica diventa rilevante nella presente condizione sperimentale per la quale ancora oggi in letteratura si discute se essa sia da considerarsi una condizione patologica, e quindi da trattare, oppure un sintomo sottosoglia il cui trattamento si rende necessario dopo l'instaurarsi di una vera e propria ipofunzione tiroidea.

## **APPENDICE I:**

### **Sistema endocrino tiroideo**

#### **A1) Cenni di embriologia, anatomia e fisiologia della tiroide**

La tiroide è una struttura specializzata nella produzione, nell'immagazzinamento e nel rilascio degli ormoni tiroidei.

Da un punto di vista filogenetico, la presenza sia degli ormoni tiroidei che dei loro precursori in alcuni invertebrati, pur non conoscendone ancora la funzione, suggerisce un ruolo primario di questi ormoni in funzioni fisiologiche di base. Salendo nella scala filogenetica, nei protocordati è presente una struttura in grado di produrre ormoni tiroidei, tuttavia, fatto abbastanza curioso, questi ormoni non sembrano avere gli effetti conosciuti nei vertebrati.

La tiroide, descritta per la prima volta da Galeno, è un organo epiteliale, la cui denominazione, coniata nel 1656 da Wharton, deriva dai suoi rapporti topografici con la cartilagine tiroide della laringe, che ha la forma di scudo (tyro=scudo; eido=immagine).

La ghiandola appare nella terza-quarta settimana di vita embrionale come un diverticolo endodermico indovato nel pavimento dell'intestino faringeo nell'area indicata come forame cieco. L'abbozzo della tiroide penetra nel sottostante mesoderma e discende anteriormente all'intestino faringeo come un diverticolo bilobato. Durante la migrazione rimane collegata al pavimento dell'intestino anteriore mediante un canale (dotto tireoglosso) che si solidifica e poi scompare. La parte inferiore del dotto può permanere dando origine al lobo piramidale. Residui del dotto possono formare ghiandole tiroidee accessorie o trasformarsi in cisti. Alla settima settimana raggiunge la sua posizione finale di fronte alla trachea, acquistando l'istmo e i due lobi laterali. Dalla quinta tasca faringea o corpo ultimo-branchiale (quarta-quinta settimana) originano alcune cellule di origine neuroectodermica (le cellule C o parafollicolari) che in seguito vengono incorporate all'interno dell'abbozzo tiroideo. La differenziazione embriogenetica della tiroide umana è caratterizzata da tre fasi morfogenetiche: all'iniziale fase precolloidea, che si estende dalla 7° alla 13° settimana, segue, dalla 13° alla 14° settimana, la fase colloidea, per concludersi con la fase follicolare, che inizia dopo la 14° settimana. Peraltro tale sequenza di eventi differenziativi non è uniformemente riconoscibile in tutto l'ambito ghiandolare,

osservandosi nei diversi distretti la contemporanea presenza di tutte le diverse fasi maturative. Durante la fase follicolare della istogenesi tiroidea si assiste ad un progressivo dilatarsi del follicolo con sempre più abbondante deposito di colloide, delineandosi la struttura follicolare dell'adulto e, con l'inizio della organizzazione follicolare e dell'accumulo di colloide, compaiono simultaneamente la funzione iodoconcentrante e quella ormonogenetica. La tiroxina (T4) compare in circolo al 78° giorno, ed aumenta, rapidamente e progressivamente, sino alla nascita, osservandosi una correlazione lineare della sua concentrazione con la lunghezza del feto. Il livello della triiodotironina (T3) è basso (Larsen et al., 1995).

Lo sviluppo ontogenetico dei diversi distretti dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide è fondamentalmente completato dopo il terzo mese di gestazione. La diversificazione maturativa che si verifica durante lo sviluppo ontogenetico indica che le interazioni ipotalamo-ipofisarie sono operanti sin dalle prime fasi dello sviluppo fetale, mentre la tiroide, nella sua iniziale differenziazione morfogenetica, è del tutto autonoma dai sistemi regolatori neuroendocrini centrali. Nell'anencefalia, infatti, l'ipofisi anteriore e la tiroide sono normalmente presenti. Per quanto attiene all'ontogenesi della calcitonina è stato dimostrato che al momento del parto la concentrazione della calcitonina è significativamente più elevata nel sangue ombelicale, suggerendo così l'origine fetale piuttosto che quella placentare. Può ritenersi quindi che alla calcitonina competa un ruolo omeostatico nel bilancio calcio-fosforico e nella formazione del tessuto osseo sia nella vita intrauterina che in quella post-natale.

La tiroide (del peso di circa 20 grammi) è costituita da due lobi ghiandolari (destro e sinistro) connessi da un sottile istmo posto tra il 2° ed il 4° anello tracheale. A volte può essere presente un terzo lobo, il lobo piramidale, a partenza dall'istmo o dalle porzioni mediali dei lobi laterali. Alloggiata nel collo, è contigua posteriormente alla trachea. Anteriormente è in buona parte ricoperta dai muscoli sternoiideo e sternotiroideo. E' rivestita da una guaina connettivale che si introflette e forma la guaina del fascio vascolo-nervoso. L'elevata vascolarizzazione della tiroide (5 ml/g/min) è garantita dalle arterie tiroidee superiori ed inferiori, rami della carotide esterna e della succlavia. Il sistema venoso è costituito dalle vene tiroidee superiori ed inferiori ed è tributario delle vene giugulari interne e succlavia. L'innervazione deriva



principalmente dal sistema nervoso autonomo, avendo come funzione principale la regolazione del flusso sanguigno. Il controllo della secrezione da parte del sistema nervoso autonomo e delle catecolamine è sempre stato proposto, ma mai dimostrato. I linfatici della ghiandola confluiscono con gli altri linfatici del collo e del mediastino. Pur essendo secreto nel sistema venoso, una quota del rilascio degli ormoni tiroidei e della maggior parte delle iodoproteine avviene nei linfatici.

L'unità funzionale della tiroide è il follicolo (50-500 µm di diametro). Ognuno di essi è costituito da un singolo strato di cellule epiteliali, i tireociti (o cellule follicolari) che delimitano una cavità centrale (lume follicolare) che contiene la colloide, sostanza gelatinosa costituita essenzialmente da tireoglobulina. I tireociti sintetizzano gli ormoni iodati. Adiacenti ai tireociti, sono presenti cellule di maggiori dimensioni (le cellule parafollicolari o cellule C) che sintetizzano la calcitonina, peptide di 32 aminoacidi scarsamente specie-specifico. Gli ormoni tiroidei hanno un vasto campo d'azione ed interagiscono con quasi tutti i distretti dell'organismo; aumentano il consumo di ossigeno e la produzione di calore, aumentano il metabolismo del colesterolo, aumentano l'assorbimento intestinale dei carboidrati e diminuiscono il glicogeno epatico, aumentano l'attività del sistema simpatico, stimolano il sistema nervoso centrale, stimolano la normale crescita e sviluppo corporeo. La calcitonina esplica il suo effetto ipocalcemizzante ed ipofosforemizzante inibendo sia il riassorbimento osseo per inibizione degli osteoclasti e degli osteociti, e sia il riassorbimento di calcio, fosfati e sodio a livello del tubulo renale (Dumont, Corvilain, Maenhaut, 2002).

## **A2) Gli ormoni tiroidei (OT), la loro regolazione e i loro effetti**

Gli ormoni tiroidei, tri-iodotironina (T3) e tetra-iodotironina (T4), sono in grado di modulare tutte le vie metaboliche attraverso modificazioni del consumo di ossigeno ed alterazioni del metabolismo di proteine, lipidi, carboidrati e vitamine. Tramite tali alterazioni metaboliche, gli OT influenzano la sintesi e la degradazione di altri ormoni e fattori di crescita e quindi indirettamente il sistema endocrino.

Gli OT sono sintetizzati dalle cellule follicolari e rilasciati nel circolo sistemico in risposta al TSH, dove si legano a specifiche proteine leganti gli OT: la proteina

legante la tiroxina (thyroxine-binding globulin TBG), la prealbumina legante la tiroxina (thyroxine binding prealbumin TBPA) e l'albumina.

La più rappresentata ed affine è la TBG. In condizioni fisiologiche, la TBG lega quasi completamente T4 e T3: la piccola frazione non legata (o libera:  $F = free$ ) è responsabile dell'attività biologica ormonale. Le quote libere dell'ormone (FT4 ed FT3) hanno uguale concentrazione ematica. Anche se l'emivita plasmatica T4 è di 4-5 volte superiore a quella di T3, T3 si lega alle cellule bersaglio con maggiore attività (circa 10 volte superiore a T4) ed è pertanto la forma ormonale maggiormente attiva. E' per questo che a livello periferico T4 ematica è trasformata in T3 o in *reverse* T3 (rT3).

Il rapporto di secrezione di T3 e T4 è di 14:1 nell'uomo. L'unica fonte di T4 endogeno è la tiroide, mentre T3 deriva per la maggior parte dalla desiodazione della T4 a livello del fegato e del rene. Sono state identificate tre forme di desiodasi, differenti per specificità, cinetica e distribuzione.

Gli OT agiscono sulle cellule bersaglio a livello genomico tramite l'interazione con specifici recettori nucleari appartenenti ad una famiglia di fattori di trascrizione nucleare ormono-responsivi simili per struttura e meccanismo d'azione agli ormoni steroidei. Dopo il legame dell'ormone tiroideo al recettore nucleare, il complesso ormone-recettore si lega ad una regione regolatoria del gene (elementi di risposta all'ormone, thyroid-hormone response elements - TRE) dando inizio ad una serie di eventi che culminano con un aumento della trascrizione del DNA, della traduzione dell'mRNA e della sintesi proteica. Sono stati identificati due geni del recettore per gli ormoni tiroidei, denominati  $\alpha$  e  $\beta$ , e sebbene entrambi i recettori siano altamente omologhi, essi sono codificati da geni su cromosomi separati ed hanno differente affinità per la T3. Sono state identificate due varianti per ogni gene: il recettore  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  di T3 (il secondo, stranamente non lega la T3) e i recettori  $\beta 1$  e  $\beta 2$  di T3.

L'ingresso nelle cellule bersaglio avverrebbe per diffusione passiva grazie a un meccanismo di trasporto, tramite un trasportatore saturabile, stereospecifico e ATP dipendente.

### **A2a) Le desiodasi**

Si stima che la concentrazione giornaliera di T4 vari tra 70 e 90 microgrammi, mentre quella di T3 tra 15 e 30. L'80% della T3 sierica deriva dalla

desiodazione della T4 nei tessuti tramite la rimozione dello iodio in posizione 5 dell'anello esterno. Il principale sito di conversione extratiroideo è il fegato, e la maggior parte dei tessuti usa la T3 derivante dall'ormone circolante. Per il cervello e l'ipofisi la fonte è la generazione locale di T3.

Nei mammiferi sono stati identificati tre tipi di desiodasi: le desiodasi di tipo 1 e 2 catalizzano la monodesiodinazione dall'anello esterno. La D1 catalizza anche la rimozione di iodio dall'anello interno, ma preferisce come substrati i derivati solfati. La desiodasi di tipo 3 catalizza la desiodinazione dell'anello interno avendo come substrato specifico T3 (Larsen 1998). Tutti e tre gli enzimi contengono una seleniocisteina nel sito attivo, che è la regione a più alta omologia. Questo raro aminoacido ha proprietà che lo rendono ideale per la catalisi di reazioni ossidoriduttive come la desiodinazione e la riduzione di perossido di idrogeno da parte della glutadione-perossidasi (Berry e Larsen, 1994).

Le cellule tiroidee estraggono lo iodio dal plasma e lo concentrano nella ghiandola tramite un processo attivo di concentrazione contro gradiente elettrochimico, che implica un dispendio di energia assicurata dal sistema ATPasico Na/K dipendente. Questo è un meccanismo saturabile, energia-dipendente, che produce un livello di iodio intracellulare da 20 a 40 volte più elevato rispetto al plasma. La capacità della tiroide di concentrare lo iodio è controllata dall'attività di un sodio/iodio symporter (NIS) recentemente identificato, una proteina localizzata sulla membrana del tireocita. Il ruolo del NIS in varie patologie e stati fisiologici associati con alterazioni della funzione tiroidea è attualmente in corso di definizione. Una volta internalizzato nella tiroide lo iodio è ossidato prima di fissarlo ai residui tirosinici della tireoglobulina. Lo ioduro intracellulare migra verso la membrana apicale. Nel frattempo, il reticolo endoplasmatico del tireocita sintetizza 2 proteine chiave, la perossidasi (TPO) e la tireoglobulina (Tg). La tireoglobulina è una glicoproteina con peso molecolare di 660 KD che serve come substrato per la iodinazione e la formazione dell'ormone. La TPO è posta a livello della membrana apicale, dove riduce l' $H_2O_2$ , elevando lo stato di ossidazione dello ioduro ed attaccando lo iodio ai residui tirosinici nella Tg. L' $H_2O_2$  è generato dal NADPH e dal calcio.

## **A2b) Ormoni tiroidei e sistema nervoso**

Mentre l'effetto degli OT sul cervello in via di sviluppo sembra essere stato ormai chiarito, rimane ancora da definire quello sul cervello dell'adulto.

La mancanza congenita degli OT si manifesta con anomalie nello sviluppo di tutti gli apparati: tale sindrome è chiamata cretinismo (Delange 1996). In particolare questa sindrome si caratterizza per una serie di deficit funzionali che comprendono ritardo mentale, atassia, spasticità, sordità e che sono dovuti a danni a livello della corteccia, dei gangli della base, del cervelletto e della coclea. Inoltre si osservano alterazioni della mielinizzazione e compromissione della migrazione e differenziazione cellulare.

Per quanto riguarda gli effetti degli OT sul cervello adulto, la loro influenza diretta è dimostrata dall'abbondante distribuzione dei recettori per la T3 e dalla fine regolazione delle concentrazioni di T3 e T4 nel sistema nervoso centrale. Queste osservazioni suggeriscono come una piccola variazione nel metabolismo dello iodio possa produrre grandi effetti a livello comportamentale, e per contro, come piccoli cambiamenti della concentrazione di T4 circolante possano avere conseguenze sulle funzioni mentali.

Sono state proposte varie ipotesi per spiegare la correlazione tra OT e le funzioni del sistema nervoso centrale, e la maggior parte degli studi si sono focalizzati sulla relazione con i neurotrasmettitori centrali, come le catecolamine (Baldini et al., 1997).

Anche se il meccanismo esatto non è ancora chiaro, sembra che gli OT agiscano sulle funzioni cerebrali attraverso un potenziamento dell'effetto dell'acetilcolina (ACh), della noradrenalina (NA) e della serotonina (5HT).

Mentre i recettori beta-adrenergici stimolano la produzione di AMPciclico attraverso l'interazione con proteine G stimolatrici, i recettori alfa2-adrenergici interagiscono con proteine G inibitrici provocando la riduzione di cAMP.

I secondi messaggeri dei recettori alfa1-adrenergici sono invece l'inositolo-trifosfato e il diacil-glicerolo, e portano entrambi ad un aumento della concentrazione di  $Ca^{2++}$  intracellulare.

Alcuni studi hanno indicato che gli OT aumentano il numero e/o gli effetti beta-adrenergici delle catecolamine a livello cellulare attraverso vari meccanismi, che possono essere raggruppati in due grosse categorie:

- Gli OT aumentano l'accumulo di cAMP in risposta alla stimolazione dei recettori beta. Tale aumento sembra essere dovuta alla capacità di T3 di reprimere alcune specie di sub-unità alfa e beta della proteina G inibitrice e attraverso la *down-regulation* di alcune fosfodiesterasi responsabili della degradazione di cAMP.
- Gli OT amplificano gli effetti del cAMP, grazie all'attivazione sinergica di almeno due geni: quello della fosfoenolpiruvato-carbossichinasi e quello dell'enzima *brown adipose tissue uncoupling protein 1*. Entrambi questi geni presentano a livello del promotore sia un elemento di risposta per cAMP sia un elemento di risposta TRE.

Da queste premesse risulta quindi evidente come l'effetto principale degli OT sul SNC sia legato ad una loro modulazione catecolaminergica. L'alterazione della modulazione delle catecolamine, inoltre, da tempo è considerata uno degli elementi fisiopatogenetici dei disturbi dell'umore e d'ansia. Su questa base è stato suggerito che l'alta incidenza di comorbidità tra disfunzioni tiroidee o disturbi della sfera affettiva possa trovare la sua base biologica proprio in un'alterata regolazione delle amine biogene, in particolare la noradrenalina (NA) e la serotonina (5HT), primariamente indotta dal disturbo ormonale (Whybrow e Prange 1981).

Nel SNC la NA è localizzata nell'ipotalamo, nell'amigdala e nel giro dentato. I suoi neuroni originano dal *locus coeruleus*, o dal tegmento laterale mesencefalico per raggiungere cellule bersaglio a livello corticale, sotto-corticale e spinale.

Alcuni studi hanno dimostrato che la tireotomia comporta gravi alterazioni nel sistema noradrenergico sia a livello pre- che post-sinaptico del tutto reversibili dopo somministrazione di T4, suggerendo un ruolo modulatorio degli OT sul sistema noradrenergico centrale (Tejani e Butt, 2000). Ulteriori evidenze derivano da studi di mapping immuno-istochimici che hanno dimostrato come la T3 presenti una elevata concentrazione nei nuclei noradrenergici e nei loro siti di proiezione.

Per quanto riguarda la serotonina (5HT), questo neurotrasmettitore si concentra a livello sistemico nelle cellule enterocromaffini del tratto gastrointestinale, nelle piastrine, e a livello del SNC nei nuclei del rafe tronco-encefalici. I nuclei del

rafe rostrali proiettano al telencefalo, mentre quelli caudali al tronco encefalico e al midollo spinale. Il nucleo del rafe mediano dà un importante contributo all'innervazione del sistema limbico, mentre quello dorsale alle regioni corticali e al neostriato. La 5HT agisce attraverso l'interazione di 14 recettori, tutti metabotropici a parte il recettore 5HT<sub>3</sub> che è ionotropo.

Animali adulti resi sperimentalmente ipotiroidei, presentano un elevato turnover serotoninergico nel tronco encefalico ed una riduzione di 5HT e dei recettori serotoninergici a livello corticale. La successiva somministrazione di OT a questi animali si associa ad un incremento delle concentrazioni corticali di 5HT ad una desensibilizzazione, limitatamente ai nuclei del rafe, degli autorecettori inibitori 5HT<sub>1A</sub>, che a sua volta induce un aumento del rilascio corticale ed ippocampale di 5HT (Bauer et al., 2002). Nell'uomo, gli stati di modulazione neuroendocrina in pazienti ipotiroidei hanno mostrato una ridotta risposta serotoninergica che è del tutto reversibile dopo terapia sostitutiva con OT (Bauer et al., 2002).

Ci sono alcune indicazioni che suggeriscono che la somministrazione di OT porti ad un aumento della sensibilità dei recettori 5HT<sub>2</sub> nei neuroni corticali (Bauer e Whybrow, 2001). Un recente studio ha indicato inoltre un ruolo sinergico della T<sub>3</sub> e dei recettori 5HT<sub>1A</sub> per l'espressione del BDNF (brain derived neurotrophic factor, Vaidya 2001).

Dall'osservazione dei vari studi si è postulato che i meccanismi attraverso i quali gli OT possono esplicare i loro effetti modulatori nei disturbi affettivi sia l'aumento della trasmissione serotoninergica, a sua volta ottenuta mediante la riduzione della sensibilità degli autorecettori 5HT<sub>1</sub> nel rafe e l'aumento della sensibilità dei recettori 5HT<sub>2</sub> corticali.

Per quanto riguarda l'ultimo sistema neurochimico implicato nelle interazioni tra OT e SNC, quello colinergico, presenta una elevata distribuzione in tutto il SNC e svolge un ruolo fondamentale nelle funzioni cognitive in particolare nell'attenzione, apprendimento e memoria, e nella genesi e mantenimento del sonno REM (Bassant 1999).

I neuroni colinergici della base del telencefalo (BT), localizzati nel nucleo basale del Meynert, nella banda diagonale del Broca e nel setto mediale, proiettano alla corteccia cerebrale, all'amigdala, alla formazione ippocampale e ad alcuni nuclei talamici. Alle alterazioni del sistema colinergico consegue una

modificazione dell'elaborazione degli stimoli sensoriali e delle attività di ordine superiore, favorendo così lo sviluppo di disturbi neuro-psichiatrici: quando l'attività colinergica si riduce i quadri clinici generati sono di tipo demenziale mentre quando l'input colinergico aumenta si ha l'induzione di sintomi psicotici, di ansia generalizzata e fobica (Sarter e Bruno 1999; Smith et al., 2002).

Le relazioni tra gli ormoni tiroidei e sistema colinergico sono presenti sia nello sviluppo che durante la vita adulta.

Gli effetti degli OT sulle funzioni cognitive possono essere messe in luce attraverso l'analisi delle loro interazioni con la scopolamina, antagonista muscarinico in grado di indurre importanti deficit cognitivi. La co-somministrazione di OT è in grado di ridurre gli effetti della scopolamina, probabilmente grazie all'aumento della concentrazione di Ach nei terminali nervosi (Toide 1989).

Studi più recenti hanno messo in evidenza una correlazione positiva tra i livelli di T4 e punteggi dei test cognitivi (Prinz 1999, Volpato 2002).

Lo stretto legame tra OT e vari sistemi neurochimici centrali rende quindi conto delle alterazioni cognitive e affettive presenti in soggetti con patologia tiroidea, che possono riassunte in:

- Disturbi dell'attenzione
- Disturbi della memoria e dell'apprendimento
- Alterazioni del ciclo sonno-veglia
- Demenza
- Psicosi
- Paura ed ansia

Le alterazioni cognitive in corso di disfunzione tiroidea possono essere talmente gravi da indurre quadri clinici sovrapponibili alla demenza. E' stato infatti osservato che l'insufficienza tiroidea può essere causa di demenza secondaria, classicamente definita come una forma di declino cognitivo reversibile, sebbene non sia ancora chiaro se la reversibilità, dopo una corretta terapia, possa essere completa (Haupt e Kurz, 1993; Bauer e Whybrow, 2001).

Esistono tuttavia anche delle relazioni tra le disfunzioni tiroidee e demenza primaria, come la malattia di Alzheimer (MA). Questa associazione non è solo

di tipo fenomenico, cioè legata all'osservazione clinica, ma anche fisiopatogenetica, con l'identificazione di meccanismi a livello cellulare e molecolare.

L'associazione tra ipotiroidismo e MA è stata osservata in differenti studi (Gangli et al., 1996; Breter et al., 1991), sia tra MA familiare e patologia tiroidea autoimmune (Ewins et al., 1991) che tra MA sporadica e patologia tiroidea (Genovesi et al., 1996), anche se in quest'ultimo caso l'associazione è meno stretta. I risultati degli studi condotti da Ewins et al. (1991) suggeriscono la presenza di un fattore genetico predisponente lo sviluppo di patologia tiroidea autoimmune localizzato sul cromosoma 21, in prossimità del gene APP. Anche a livello cellulare e molecolare molti dati hanno confermato le relazioni tra tiroide e metabolismo dell'APP: le cellule epiteliali della tiroide producono grandi quantità di APP e contengono l'intera sequenza della beta-amiloide. I frammenti di questa proteina possono essere rilasciati nella circolazione sistemica dopo danneggiamento delle cellule tiroidee (Schmitt et al., 1995); gli OT regolano negativamente l'espressione del gene APP (Belandia et al., 1998) e la secrezione di APP da parte dei tireociti viene stimolata dal TSH (Graebert et al., 1995). Quindi la disfunzione tiroidea potrebbe diventare un fattore di rischio anche per la malattia di Alzheimer e non solo per la demenza secondaria.

### **A3) TRH**

Il TRH è un tripeptide, piroGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>, che viene rilasciato ad opera di una peptidasi da una molecola più ampia, il pre-pro-TRH. Il TRH è presente in specie prive di ghiandola pituitaria e pertanto si sarebbe sviluppato originariamente come una neurosecrezione primitiva ancor prima dell'evoluzione della tireotropina.

Nell'uomo il TRH è espresso nell'ipotalamo, cervello, cellule C della tiroide, cellule Beta del pancreas, miocardio, testicolo, prostata e midollo spinale. La regione parvicellulare dei nuclei paraventricolari dell'ipotalamo è la fonte di TRH che regola la secrezione di tireotropina TSH. I corpi dei neuroni che producono TRH sono innervati da assoni contenenti catecolamine, neuropeptide Y e somatostatina che possono influenzare la sintesi del pre-proTRH.



Come molti altri peptidi neuroattivi, TRH è ritenuto essere anche un neurotrasmettitore o neuromodulatore che influenza l'eccitabilità neuronale. A sostenere questa nozione vi sono vari dati che documentano che:

- è enzimaticamente processato da un precursore più grande
- è ampiamente distribuito in differenti vie della asse nervoso
- è contenuto in un *pool* di granuli secretori nei terminali sinaptici
- interagisce con almeno due proteine G accoppiate ai recettori TRH-R1 e R2

E' stato proposto (Gary e Sevarino, 2003) che il TRH sia alla base di un sistema omeostatico formato da componenti funzionalmente integrate, che agirebbero in maniera coordinata per normalizzare l'intensità e la qualità dell'attività del SNC. Questi componenti sono:

- il sistema neuroendocrino ipotalamico-ipofisiotrofico
- il sistema tronco encefalico-mesencefalo-spinale
- il sistema limbico-corticale
- il sistema cronobiologico

Gli effetti stimolanti del TRH dipendono dal legame del peptide a recettori presenti sulla membrana plasmatica delle cellule tireotrope, e la sua azione è principalmente mediata dall'idrolisi del fosfatidil-inositolo che a sua volta porta alla fosforilazione delle protein-chinasi e all'aumento del Calcio libero plasmatico (Heinfinck et al 1994).

#### Sistema neuroendocrino ipotalamico-ipofisiotrofico

Quest'asse serve come regolatore del metabolismo. Numerosi studi hanno caratterizzato la risposta TSH alla stimolazione di TRH in pazienti depressi, e in all'incirca tutti questi studi è stato riportato che un sottogruppo di pazienti ha dimostrato una risposta diminuita al TRH, forse per *down-regulation* dei recettori del TRH pituitari.

#### Sistema tronco encefalico-mesencefalo-spinale

Il tessuto spinale di diversi organismi incluso l'uomo contiene abbondante concentrazioni di TRH e di recettori del TRH. I corpi cellulari contenenti TRH nei nuclei del rafe proiettano attraverso la regione centrale del midollo spinale e terminano nelle lamine II e IX, e oltre a TRH contengono serotonina e sostanza

P. Ciò suggerisce un'interazione fisiologicamente importante tra TRH e queste sostanze neuroattive colocalizzate. I recettori per il TRH sono stati identificati nel midollo spinale nella lamina II, che contiene la sostanza gelatinosa, e nella lamina IX in prossimità del corno anteriore dei motoneuroni  $\alpha$ . Tale *pattern* di localizzazione suggerisce un ruolo nella modulazione della funzione motoria e nel dolore.

Studi elettrofisiologici hanno messo in evidenza effetti di tipo eccitatorio del TRH sull'attività dei motoneuroni e sui riflessi spinali.

#### Sistema limbico-corticale

Molti effetti del TRH sembrano legati alle aree corticali e limbiche. Questi effetti spesso coinvolgono altri neurotrasmettitori, e studi hanno messo in evidenza l'efficacia del TRH nel trattamento della depressione.

Un'altra risposta comportamentale dovuta alla somministrazione di TRH è la reversibilità della sedazione indotta farmacologicamente. Inizialmente descritto come potenzialità del TRH di accorciare il sonno indotto dai barbiturici e dall'etanolo, questo effetto analettico è stato descritto in seguito all'amministrazione di altre sostanze deprimenti il SNC, inclusi gli oppiacei, le fenotiazine e le benzodiazepine. I substrati anatomici di questo effetto analettico sono stati localizzati, ed è stato trovato che la zona maggiormente sensibile è l'area settale mediale. Il circuito di questa risposta comportamentale sembra coinvolgere la classica proiezione colinergica del setto-ippocampale.

In accordo con gli effetti analettici, il TRH insieme a vari suoi analoghi migliora le performance in vari parametri di apprendimento e di memoria.

#### Sistema cronobiologico

Numerose evidenze sostengono che vi sia una relazione tra TRH e i sistemi biologici che mostrano un'attività ritmica. Il TRH e i suoi recettori sono stati individuati nel nucleo sovrachiasmatico dell'ipotalamo, orologio biologico del ritmo circadiano dei mammiferi.

#### Effetti clinici del TRH

La somministrazione di TRH sembra determinare un miglioramento della sintomatologia depressiva con attivazione EEGrafica simile a quella indotta da sostanze stimolanti e antidepressive non sedative (Itil et al, 1975; Szuba et al, 1996; Marangell et al, 1997).

La grande quantità di azioni svolte dal TRH richiede una nuova concettualizzazione, che può essere illustrata tenendo in considerazione due delle sue proprietà: è analettico e anticonvulsivante. Analettico solo quando l'organismo è sedato, e anticonvulsivante solo quando l'organismo è soggetto a epilessia. Questo mostra che il TRH è un agente omeostatico, che si oppone a varie perturbazioni che affliggono sia il SNC e che il sistema nervoso periferico (Fig. 16).

I livelli di TRH sono alterati nella patologia tiroidea; pertanto è possibile che ciò possa contribuire alla sintomatologia tipica dell'ipotiroidismo.

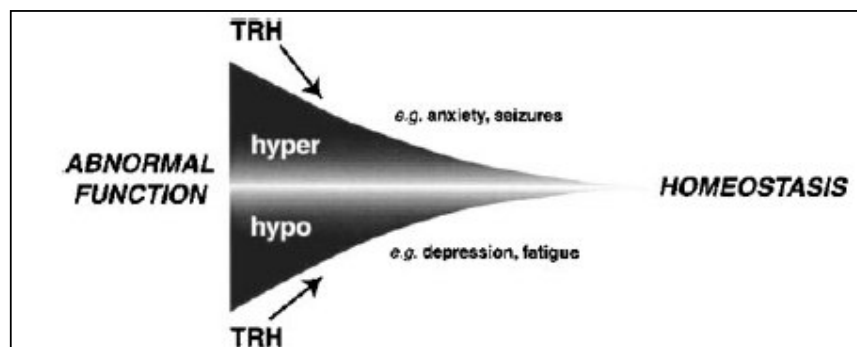


Fig. 16. TRH e omeostasi

#### A4) TSH

Il TSH è il principale agente del controllo dello stato morfo-funzionale della tiroide. La sua secrezione è regolata da due principali meccanismi: il “feedback” negativo da parte degli OT e il controllo “open loop” da parte di fattori ipotalamici.

Una riduzione del tasso ematico degli ormoni tiroidei determina la secrezione di TSH, mediata da TRH, mentre un incremento degli ormoni tiroidei in circolo inibisce la secrezione di TSH. Per quanto riguarda i fattori intrinseci alla ghiandola, questi dipendono principalmente dalla concentrazione iodica intratiroidea. Se questa è ridotta, c'è una maggiore sensibilità della ghiandola al TSH e quindi una maggiore capacità di intrappolare lo iodio plasmatico ed infine una quasi esclusiva produzione di T3. In caso di eccesso, al contrario, c'è minore sensibilità della ghiandola al TSH e si può osservare il cosiddetto effetto Wolff-Chaikoff, ovvero si blocca l'organificazione dello iodio e di conseguenza la sintesi di ormoni.

L'inibizione della secrezione di TSH dipendente dagli OT può essere superata da stimoli limbici o dall'esposizione al freddo (Reichlin,1998). La regolazione ipotalamica del rilascio di TSH è anche influenzata da altri due fattori inibenti: la dopamina e la somatostatina.

I neuroni secernenti TRH che regolano la secrezione di TSH sono innervati da fibre stimolanti ed inibenti che provengono dal tronco, corteccia frontale, cellule del nucleo paraventricolare e da collaterali provenienti dagli stessi neuroni secernenti TSH.

La secrezione di TSH è influenzata anche da altri ormoni come gli estrogeni, i glucocorticoidi e l'ormone della crescita (GH). La concentrazione plasmatica di TSH nell'uomo presenta un ritmo circadiano, con un massimo tra le 9 di sera e le 5 del mattino, e un minimo tra le 4 e le 7 del pomeriggio.

Le basi molecolari della soppressione del rilascio di TSH sono state chiarite recentemente: le citochine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  inibiscono direttamente la secrezione di TSH ed inducono le alterazioni funzionali caratteristiche della "euthyroid sick syndrome". Lo stress è in grado di aumentare l'attività ipotalamo-ipofisaria; i fattori psicologici agiscono attraverso il sistema limbico, ampiamente connesso all'ipotalamo. Il digiuno inibisce la funzione ipotalamo-ipofisaria; ciò che è chiaramente manifesto nell'anoressia nervosa durante la quale si osserva una riduzione di T3 accoppiata a livelli bassi di TSH.

## APPENDICE II

### **Ipotiroidismo subclinico e alterazioni delle funzioni cardiovascolari e metaboliche**

Il sistema cardiovascolare è uno dei principali organi bersaglio degli ormoni tiroidei (Klein e Ojamaa, 2001). I meccanismi cellulari attraverso cui gli ormoni tiroidei influenzano la funzione sistolica e diastolica cardiaca sono complessi, interessando l'espressione e la funzione di diversi enzimi e proteine coinvolti nella performance cardiaca quali la CA-ATPasi del reticolo sarcoplasmatico (SERCA II), la Na/K ATPasi cardiaca, la sintesi delle catene pesanti alfa/beta della miosina, la stimolazione di recettori adrenergici (Klein e Ojamaa, 2001). Gli ormoni tiroidei inoltre sembrano svolgere un ruolo importante anche nel controllo della modulazione vasomotoria periferica. L'effetto vasodilatante degli ormoni tiroidei già noto da molto tempo sembra dipendere non tanto da un aumento della produzione di calore e da un accumulo di prodotti terminali del catabolismo cellulare come ritenuto fino ad un recente passato, quanto da un effetto diretto ormonale sull'endotelio e sulla parete muscolare arteriolare (Klein e Ojamaa, 2001). Gli effetti della disfunzione tiroidea, sia in termini di aumentata che ridotta funzione, sull'omeostasi cardiovascolare sono ben conosciuti nella pratica clinica (Osman et al., 2002; Klein e Ojamaa, 2000). Alcuni studi recenti hanno messo in evidenza nei pazienti SHYPO, rispetto ai controlli eutiroidei, un aumento dello spessore del setto intraventricolare diastolico, della parete posteriore e dell'indice di massa del ventricolo sinistro (Biondi e Fazio, 2005). Alcune modificazioni della funzione cardiaca, quali un alterato rilassamento diastolico ed una ridotta tolleranza all'esercizio fisico, sono reversibili con la terapia ormono-sostitutiva (Biondi et al., 1999; Brenta et al., 2003). La morfologia e la funzione contrattile del ventricolo sinistro in condizioni basali è risultata alterata nei soggetti SHYPO (Ripoli et al. 2005). Questo è stato dimostrato mediante la risonanza magnetica cardiaca che consente un accurato studio della morfologia (volumi cardiaci) e della funzione contrattile regionale e globale (Pohost et al., 2003). In particolare mediante il "tagging", analisi quantitativa e operatore indipendente della funzione sistolica miocardica, è stata osservata una riduzione dell'ispessimento e dell'accorciamento nei soggetti SHYPO rispetto a soggetti normali.

L'interessamento del sistema cardiovascolare in corso di SHYPO non è limitato solo alla funzionalità miocardica ma riguarda anche le arterie, in particolare le coronarie.

Pochi studi epidemiologici si sono occupati della relazione tra SHYPO, arteriosclerosi ed infarto del miocardio (MI). In uno studio di popolazione effettuato su 1199 soggetti è stato osservato che l'aumento dei livelli di T4 dopo i 60 anni incrementa il rischio di mortalità per disturbi cardiovascolari (Perle et al., 2001). Recentemente è stato mostrato la concentrazione plasmatica della proteina-C-reattiva (High sensitive C-Reactive Protein) è maggiore nei soggetti SHYPO rispetto ai controlli. Il livello plasmatico di proteina-C-reattiva aumenta in caso di varie condizioni patologiche, come ad esempio durante uno stato infiammatorio. I pazienti SHYPO considerati nello studio non presentavano alcuna patologia vascolare o infiammatoria, e perciò i loro livelli di proteina-C-reattiva non erano l'espressione di condizioni patologiche. Questa osservazione è estremamente interessante dato la proteina-C-reattiva rappresenta uno dei più forti indici predittivi di rischio per le malattie cardiovascolari (Tuzco, 2005).

Gli ormoni tiroidei influenzano anche la sintesi, la mobilizzazione e il catabolismo dei lipidi. La disfunzione tiroidea potrebbe interferire quindi con il metabolismo lipidico a livello dell'espressione dei recettori delle LDL e a livello della successiva ricaptazione cellulare delle LDL (Low Density Lipoprotein) e VLDL (Very Low Density Lipoprotein).

L'anomalia lipidica più frequente rilevata nell'ipotiroidismo franco è l'ipercolestemia, caratterizzata da elevati livelli di LDL e di lipoproteina A (LipoA). Studi epidemiologici dimostrano che l'elevato livello di LipoA aumenta il rischio dei pazienti di sviluppare malattie cardiovascolari. Inoltre elevati livelli di LDL, insieme a bassi livelli di HDL (High Density Lipoprotein) e un elevato valore del rapporto colesterolo-totale/HDL, aumentano la possibilità di sviluppare patologia coronarica (CAD) (Kahaly 2000). Nonostante le conoscenze acquisite nell'ipotiroidismo franco, la relazione tra l'ipotiroidismo subclinico e metabolismo lipidico è ancora da chiarire. Fino ad oggi gli studi si sono focalizzati su due punti principali:

- 1) determinare la percentuale di SHYPO nei pazienti con ipercolesterolemia
- 2) determinare se una disfunzione ormonale anche lieve presenti effetti negativi sulla colesterolemia.

Tra le variabili più rilevanti, la letteratura considera il colesterolo totale (TC), le LDL-C, HDL-C, i trigliceridi (TG), l'apoproteina A1(apo A1), l' apoproteina A2 (apo A2) e la lipoproteina A (LipoA). In una metanalisi effettuata su 13 studi, considerando un totale di 248 pazienti, è stato messo in evidenza che l'ipotiroidismo subclinico è da due a tre volte più frequente in persone con elevati livelli sierici di colesterolo (The Lewin Group 2002). Alcuni studi epidemiologici suggeriscono una più alta incidenza di ipotiroidismo subclinico in pazienti con iperlipidemia (Canaris et al 2000).

L'insieme di questi dati fanno pensare ad un precoce interessamento del sistema cardiovascolare e del metabolismo lipidico in questa patologia indipendente dalla modesta disfunzione ghiandolare tiroidea e quindi suggeriscono un trattamento precoce con terapia sostitutiva, attualmente non strettamente raccomandato.

I potenziali benefici derivanti dalla terapia sostitutiva con L-tiroxina includono:

- la prevenzione della progressione dello SHYPO verso la malattia ipotiroidea conclamata (Perle et al., 1991; Tunbridge et al., 1995; Pirich et al., 2000)
- il miglioramento del profilo lipidico ematico con conseguente riduzione di un fattore di rischio di morte per cause cardiovascolari miglioramento della funzionalità miocardica (Biondi,2005)
- il controllo di sintomi della sfera emotiva e cognitiva con riduzione della vulnerabilità a sviluppare patologie neuro-psichiatriche (Baldini et al., 1997).

## APPENDICE III

### Stimoli audiovisivi per evocare stati emotivi

Le modalità di stimolazione usate per evocare stati emotivi comprendono l'uso di immagini (Lang, Öhman, & Vaitl, 1988, Bradley & Lang, 2000), odori (Watanuki e Kim, 2005), musica (Nyklicek et al., 1997), lettura di racconti o frasi (Velten, 1968, Watanuki e Kim, 2005), rievocazione di ricordi emotivi (Lang, 1979, Vrana, Cuthbert e Lang, 1986), ipnosi (Gemignani et al., 2000), produzione di espressioni facciali (Ekman et al., 1983, Matsumoto, 1987) e visione di filmati a contenuto emotivo (Philippot, 1993; Gross e Levenson, 1995; Hagemann et al., 1999).

In linea con le osservazioni di Rottenberg et al (2005) la scelta di questa modalità di stimolazione è stata presa in considerazione per i seguenti motivi:

1. Favoriscono l'attenzione e l'immedesimazione. I film, rispetto ad altre categorie di stimoli, hanno un filo narrativo facile da seguire e che non richiede l'interazione con lo sperimentatore. Inoltre nella cultura occidentale vi è tale diffusione dei prodotti cinematografici, che la vista di video anche a forte contenuto emotivo non viene percepita come una forte intrusione nella propria intimità emotiva ed è più facile che i soggetti abbassino le proprie resistenze cognitive.
2. Sono in grado di evocare significative reazioni soggettive e fisiologiche (Gross, 1998; Palomba et al., 2000; Frazier et al, 2004)
3. Possono essere standardizzati con studi pilota. Tenuto conto che problemi di standardizzazione sono presenti in ogni procedura di laboratorio, con i videoclip è possibile controllare il contenuto dello stimolo, apparato di presentazione e condizioni di visibilità; inoltre questi elementi sono facilmente replicabili in altri studi. La standardizzazione viene fatta attraverso la raccolta e l'analisi di questionari di autovalutazione relativi ad un ampio campione di soggetti. I film condividono un buon grado di standardizzazione con altri strumenti di stimolazione come le immagini o i suoni e rispetto ad altre modalità non prevedono la presenza di un interlocutore
4. Specificità del *target* emotivo. L'analisi del vissuto emotivo evocato dal video, come quello indotto dalle immagini, parole e ipnosi, può essere



effettuata secondo le dimensioni affettive che in funzione di emozioni discrete (Shaefer et al., 2005).

5. Confronto di un contesto emotivo con uno neutro. In analogia con gli studi cognitivi, il confronto tra un film a contenuto emotivo con quello a contenuto neutro permette di identificare solo quelle modificazioni fisiologiche che caratterizzano un'emozione discreta o una dimensione affettiva. Non tutti gli stimoli emotivi permettono di selezionare di una condizione di contesto "senza emozione". I video così come le immagini, consentono la scelta di elementi che si possono considerare emotivamente neutri per la maggior parte degli individui.
6. Multimodalità percettiva. I film stimolano contemporaneamente due canali sensoriali fondamentali per l'essere umano, quello visivo e quello uditivo. Questo è un vantaggio esclusivo di questo tipo di stimolo.
7. Stimoli ecologicamente validi. I videoclip, generalmente, non vengono percepiti come stimoli estranei nella nostra cultura, favoriscono l'immedesimazione e spesso rappresentano situazioni rilevanti dal punto di vista del benessere individuale e della sopravvivenza (gratificazioni, sconfitte, pericoli ecc...).

## APPENDICE IV

### Cenni di elettroencefalografia e applicazione dell'Analisi Componenti Indipendenti (ICA) all'elaborazione del segnale EEG

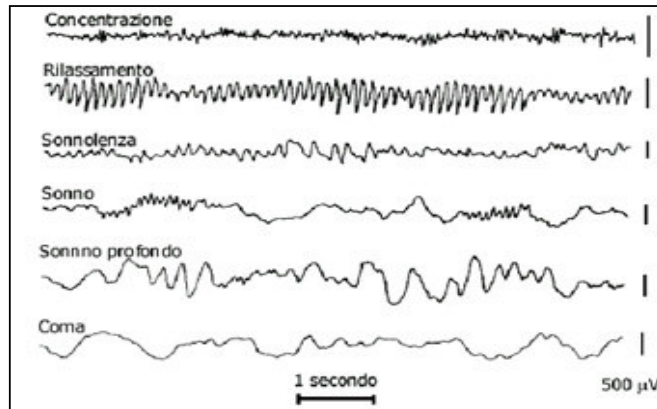
#### *1) Richiami sulle basi fisiologiche dell'EEG*

L'EEG è una misura del flusso di corrente extracellulare che viene generato dalla somma delle attività di un elevato numero di neuroni. I potenziali di superficie sono principalmente il risultato dell'attività dei neuroni corticali piramidali disposti in corrispondenza dell'area corticale sottostante l'elettrodo. L'EEG rileva la differenza di potenziale elettrico tra un elettrodo attivo, posto al di sopra della sede dove si svolge l'attività neurale, e un elettrodo indifferente, collocato ad una certa distanza dal primo. Un EEG misura quindi la differenza di potenziale tra aree dello scalpo ed è proporzionale alla corrente che scorre nella corteccia cerebrale durante l'eccitazione o l'inibizione sinaptica dei dendriti di molti neuroni piramidali, che giacciono proprio sotto lo scalpo. Il contributo elettrico di ciascun neurone corticale è straordinariamente piccolo ed il segnale deve attraversare diversi strati di tessuto non neurale, incluse le meningi, le ossa del cranio e la pelle, prima di raggiungere gli elettrodi, di conseguenza, sono necessari migliaia di neuroni attivati contemporaneamente per generare un segnale abbastanza grande da poter essere rilevato. Questo ha un interessante conseguenza sull'ampiezza del segnale EEG, che dipende in larga parte da quanto è sincronizzata l'attività dei neuroni. Se ciascuna cellula riceve la stessa quantità di eccitazione o inibizione, ma in tempi diversi, i segnali sommati risultano esigui ed irregolari. Se tutte le cellule ricevono, invece, la stessa eccitazione o inibizione contemporaneamente, i singoli segnali possono sommarsi, dando origine ad un campo elettrico più intenso. In questo caso il numero di cellule attivate e la quantità totale di attivazione possono rimanere invariate, ciò che cambia è solo la sincronizzazione dell'attività elettrica.

#### *2) Cenni sui segnali oscillatori e sullo spettro di potenza*

Per l'analisi del segnale EEG si rende necessario l'utilizzo di un approccio matematico complesso. Senza entrare nei dettagli, mediante la "trasformata di Fourier" (FTT) è possibile scomporre il segnale EEG, e

identificarne lo spettro di potenza, ovvero l'energia delle varie frequenze di cui è composto.



**Fig.17** Vari stati mentali e livelli di coscienza sono riconducibili a variazioni a particolari bande di frequenza

L'analisi spettrale ha permesso di estendere il classico significato di

associare le oscillazioni o ritmi EEG a fenomeni discreti come il sonno, la veglia, le condizioni fisiologiche o quelle patologiche (Fig. 17).

**Il ritmo delta ( $\delta$ )**, oscillazioni lente e di grande ampiezza comprese tra 0.5 e 4 Hz, sono un elemento caratteristico del sonno profondo ma anche di condizioni patologiche come il coma o forme tumorali. Questa attività è stata comunque osservata durante la veglia anche non in condizioni patologiche come in soggetti privati di una notte di sonno.

**Il ritmo teta ( $\theta$ ; 4-8 Hz)** è registrato durante alcuni stadi di sonno NREM (stadio 2 e 3 del NREM) e durante la veglia nelle regioni temporo-occipitali soprattutto nei soggetti giovani. Questo tipo di attività è stata recentemente associata a funzioni mnesiche e all'incremento dei livelli d'ansia, in particolare nelle regioni frontali mediane (Mizuki et al, 1992).

**Il ritmo alfa ( $\alpha$ ; 8-12 Hz)**, detto anche ritmo di Berger, rappresenta l'attività bioelettrica di fondo dell'uomo. Classicamente è stato associato alla veglia rilassata, e il sopraggiungere del rilassamento si esprime con un incremento di attività  $\alpha$  nelle regioni posteriori. Questo ritmo scompare durante l'apertura degli occhi (reazione d'arresto) e questa desincronizzazione è correlata ad una maggiore disponibilità delle reti corticali all'input sensoriale. Più recentemente è stato osservato che il ritmo  $\alpha$  gioca un ruolo significativo anche in alcune funzioni corticali di ordine superiore come l'integrazione fra reti neurali e l'attenzione (Klimesch et al. 1999; Klimesch, 1996; Shaw, 1996).

**Il ritmo beta ( $\beta$ ; 12-36 Hz)**, associato all'attivazione corticale, normalmente si ritrova a livello frontale, anche se durante attività mentale

intensa lo si può registrare anche in altre regioni corticali. Da un punto di vista fisiologico questo ritmo si lega a compiti motori, all'arousal e alla preparazione dei circuiti corticali per la genesi del ritmo gamma (Foster & Harrison, 2002; Aftanas & Pavlov, 2005).

**Il ritmo gamma** ( $\gamma$ ;  $>36$  Hz), rappresenta l'attività bioelettrica corticale più rapida. Scoperta solo recentemente da Gray e Singer (1989), questa attività sembra correlata a diverse funzioni tra cui l'attenzione focalizzata (Pulvermuller et al., 1997; Tiitinen et al., 1993), la memoria (Pantev, 1995; Singer e Gray, 1995), le elaborazioni linguistiche (Pantev, 1995), la percezione (Rodriguez et al., 1999), le emozioni negative (DePascalis, 1998; Gemignani et al., 2000), l'apprendimento associativo (Miltner et al., 1999) e fenomeni di integrazione dell'attività corticale (Rodriguez et al., 1999).

### *3) Applicazione delle ICA all'analisi del segnale EEG*

Alcuni segnali di natura fisiologica ed ambientale che inquinano il segnale EEG hanno un *pattern* spettrale in parte sovrapponibile ad esso, per cui, al fine di eliminare questi artefatti è necessario operare un opportuno pre-trattamento del segnale EEG.

Attraverso l'uso del metodo ICA è possibile costruire un modello statistico dei segnali inquinanti e quindi rimuoverli.

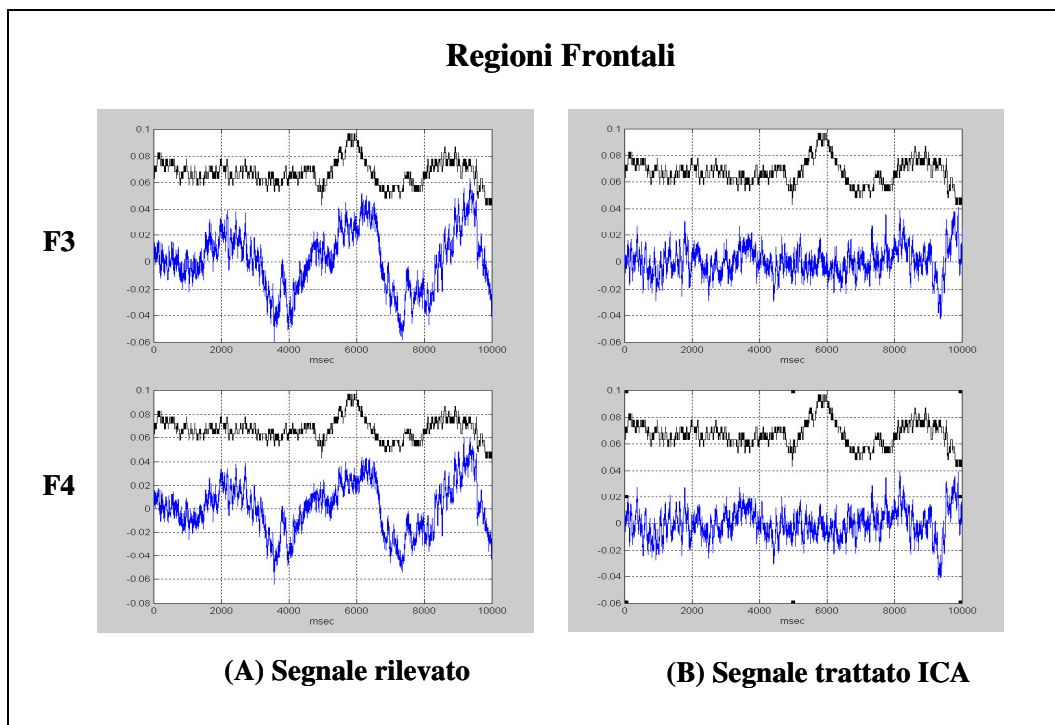
L'ICA che si basa sull'ipotesi che i segnali rilevati derivino da una combinazione lineare di sorgenti statisticamente indipendenti tra loro, non impone vincoli di ortogonalità agli assi su cui vengono proiettati i dati, e permette una maggiore generalità di approccio. Questo algoritmo porta all'estrazione di componenti indipendenti mediante la minimizzazione della mutua informazione (una misura del contenuto informativo a comune tra coppie di segnali).

Affinché i risultati siano appropriati, ovvero che le componenti ricavate corrispondano alle sorgenti attese, è necessario che siano soddisfatte le seguenti ipotesi:

1. il mezzo di propagazione sia isotropo e il tempo di propagazione trascurabile.
2. le sorgenti la cui mistura genera i segnali siano veramente indipendenti
3. il numero delle sorgenti sia pari al numero dei sensori

- L'assunto 1 è giustificato dalla teoria del volume conduttore.
- L'assunto 2 è giustificato dalla genesi indipendente dei segnali elettroencefalografico, oculografico e cardiaco.
- L'assunto 3 è quello più distante dalla realtà, sia perché gli elettrodi ricevono segnali da macroregioni e ne compiono un'integrazione, sia perché non sono definibili dei "generatori" associati a determinati ritmi.
- Per tener conto di queste problematiche non si parla, quindi, di sorgenti fisiologiche ma più propriamente di "sorgenti equivalenti" sul piano dell'informazione (Cardoso e Laheld, 1996).

Sebbene al fine della localizzazione delle sorgenti indipendenti uno dei problemi che si presentano nell'applicazione della metodica delle ICA riguarda la necessità di avere un numero elevato di siti di rilevazione del segnale, l'obiettivo di ripulitura dagli artefatti può essere affrontato agevolmente anche in presenza di pochi elettrodi quando i segnali inquinanti (ad es. quello EO Grafico) sono stati rilevati direttamente o ricostruiti in base ad un pattern di tipo frequenziale. In questo modo l'uscita dell'algoritmo ICA viene orientato a convergere, tra le molte componenti indipendenti latenti, su quelle rappresentative delle sorgenti artefattuali che sono preponderanti nei segnali extra-EEG considerati (EOG ed ECG nel presente studio); viene anche calcolato il peso di queste sorgenti nelle registrazioni EEG e, conseguentemente, il loro contributo relativo può essere sottratto al segnale acquisito, ripulendolo da tali fonti di disturbo.



**Fig 18:** In (A) sono riportati non in scala, il segnale EOG rilevato (in nero) ed il segnale EEG (in blu) nelle derivazioni frontali. In (B) sono riportati, non in scala, il segnale EOG (in nero) ed il segnale EEG (in blu) dopo rimozione degli artefatti oculari mediante l'applicazione della metodica delle ICA. F3: regione frontale sinistra; F4: regione frontale destra.

## **APPENDICE V**

### **Analisi spettrale del segnale di variabilità della frequenza cardiaca**

L'analisi dello spettro di potenza dei segnali di variabilità della frequenza cardiaca (HRV) permette di quantificare in modo non invasivo le variazioni dell'equilibrio simpato-vagale. Tale analisi è stata applicata in numerose condizioni fisiologiche e patologiche sia nell'animale che nell'uomo (Porges, 1995).

L'intervallo RR è definito come la distanza intercorrente tra due onde R consecutive del tracciato ECGrafico e la sequenza temporale non è altro che la sequenza dei valori numerici associati alla lunghezza di tali intervalli. Ogni intervallo RR corrisponde quindi al tempo intercorrente fra due battiti successivi. Il segnale RR rappresenta la serie temporale di battiti cardiaci (tacogramma) e può essere estratto dall'andamento del segnale ECG (Fig. 19).

L'analisi di Fourier del tracciato RR nell'uomo individua due componenti oscillatorie dominanti: la componente ad alta frequenza HF, con frequenza centrale di circa 0.25 Hz e sincrona con l'attività del respiro; la componente a bassa frequenza LF, con frequenza centrale di circa 0.1 Hz e attribuita al riflesso barocettivo e quindi alla risposta mediata dal sistema nervoso autonomo; in fine vi è un'ulteriore componente a frequenza molto bassa VLF (non considerata nel presente studio), con frequenza centrale inferiore a 0.03 Hz e associata all'attività simpatica.

La frequenza cardiaca oscilla spontaneamente anche in assenza di perturbazioni esterne e non tende verso l'omeostasi stazionaria se non in situazioni patologiche. Registrando le fluttuazioni di frequenza cardiaca in individui sani si ottengono serie temporali fortemente irregolari e apparentemente casuali. Esaminando invece i tracciati che precedono situazioni patologiche (per esempio, morte improvvisa dovuta ad arresto cardiaco) si osserva un tracciato molto più regolare (oscillazione regolare). La patologia è strettamente legata ad un aumento di ordine ed ad una drastica diminuzione di complessità e dimensionalità del sistema (Bigger e Fleiss, 1992).

Questo aspetto è in linea con quanto osservato nell'analisi di Fourier del segnale HRV. In un soggetto normale, l'analisi spettrale di una serie temporale di battiti cardiaci genera un ampio spettro che ricorda una situazione caotica

mentre in soggetti con disturbi cardiaci lo spettro tende ad essere più omogeneo (Bigger e Fleiss, 1992).

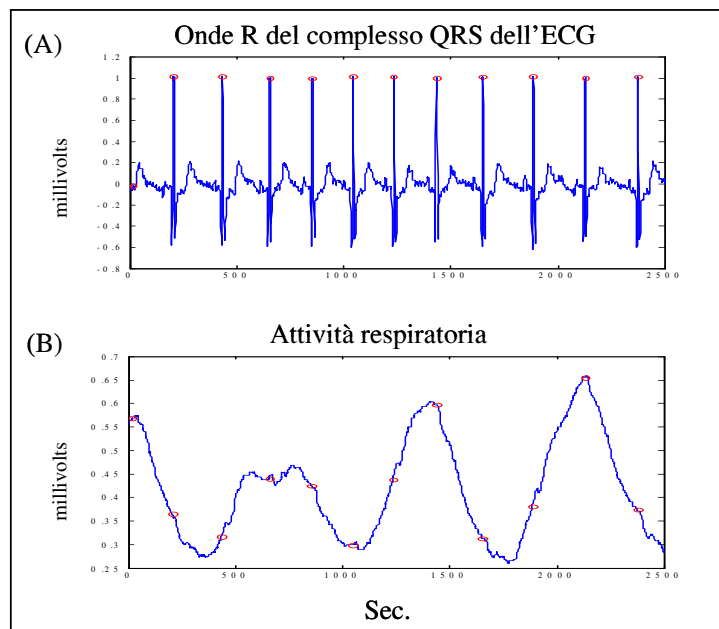


Fig. 19 In alto (A) è rappresentato, per un soggetto rappresentativo, il metodo automatico di riconoscimento delle onde R del complesso QRS dell'ECG. In basso (B) si può osservare il ricampionamento della attività respiratoria in base alle onde R dell'ECG.

### **Trattamento dei dati**

Nel presente studio dall'andamento del segnale ECG, attraverso un algoritmo di riconoscimento di complessi QRS (di tipo derivativo), è stata estratta la serie temporale di battiti cardiaci RR. La serie consecutiva degli intervalli RR è stata quindi utilizzata per stimare la densità spettrale di potenza contenuta nel segnale. Mediante il programma HRV Analysis (Niskanen et al., 2004), ogni serie RR è stata interpolata a 2Hz e sottoposta a un *detrend* per evitare la sovrastima delle potenze a bassa frequenza ( $<0.01\text{Hz}$ ) ed eventuali influenze sui valori di picco relativi alle altre bande di frequenza. Lo spettro di variabilità cardiaca è stato calcolato mediante modello non parametrico (FFT).

Non abbiamo considerato la componente al di sotto di  $0.03\text{ Hz}$ , descritta come VLF (Very Low Frequency), che è stata messa in relazione all'attività simpatica (Ori et al., 1992) poiché la serie temporale era troppo breve per ottenere una stima affidabile dello spettro di potenza di frequenze estremamente lente e che quindi non poteva essere nettamente differenziata dalla componente in continuo DC che contiene in sé rumore.



L'area sottesa dallo spettro di potenza nelle diverse bande frequenziali (VLF [0.001-0.03 Hz], LF [0.03-0.15 Hz] e HF [0.15-0.4 Hz] ) è stata integrata. Sono poi state prese in considerazione le componenti LF ed HF in unità normalizzate (nu), secondo la seguente formula (Pagani e coll., 1986, Montano e coll., 1994):

$$\frac{[valore_{epoca}]}{[potenza_{paradigma\_sperimentale}] - [VLF + Componente_{DC}]} \times 100$$

Per ciascuno spettro è stato inoltre calcolato il rapporto LF/HF (indice di equilibrio simpato-vagale), secondo i criteri proposti dalla Task Force of the European Society of Cardiology and North American Society of Pacing and Electrophysiology (1996).

## APPENDICE VI

### **Analisi delle oscillazioni spontanee (fasiche) della resistenza cutanea**

Il presente studio ha esaminato le oscillazioni spontanee (fasiche) non evento correlate della resistenza cutanea che rappresentano un indice affidabile di attività di scarica del sistema nervoso simpatico. Il numero delle oscillazioni è infatti espressione del tono medio simpatico (Alexander e Gordon, 2004)

#### *Pretrattamento del segnale*

Sebbene il segnale della resistenza cutanea sia stato digitalizzato a 250Hz, la sua dinamica risulta essere molto più lenta rispetto alla risoluzione temporale di acquisizione. Uno dei tratti a più rapida variazione del segnale, il tempo di salita *onset-peak*, è nell'ordine di 1sec o più e, in generale, il contenuto spettrale della potenza del segnale è completamente contenuto entro 3Hz. Questo ha permesso di sfruttare l'elevata ridondanza di campionamento del segnale, per depurarlo dal rumore e dagli artefatti senza la necessità di utilizzare filtraggi lineari (FFT, modelli autoregressivi o medie mobili) che non si sarebbero perfettamente adattati alla natura non-lineare del segnale.

Il filtraggio è stato realizzato distribuendo preliminarmente il segnale in 100 serie, tali per cui ogni serie contiene un punto ogni 100 del dato originale (frequenza di campionamento = 250 Hz). Pertanto, se i primi due punti della prima serie sono X1 e X101, i primi due della seconda saranno X2 e X102, e così via fino a X100 e X200. Su ognuna di queste serie così ottenute è stata effettuata un'interpolazione polinomiale di ordine 3 (cubic splines) a 250Hz.

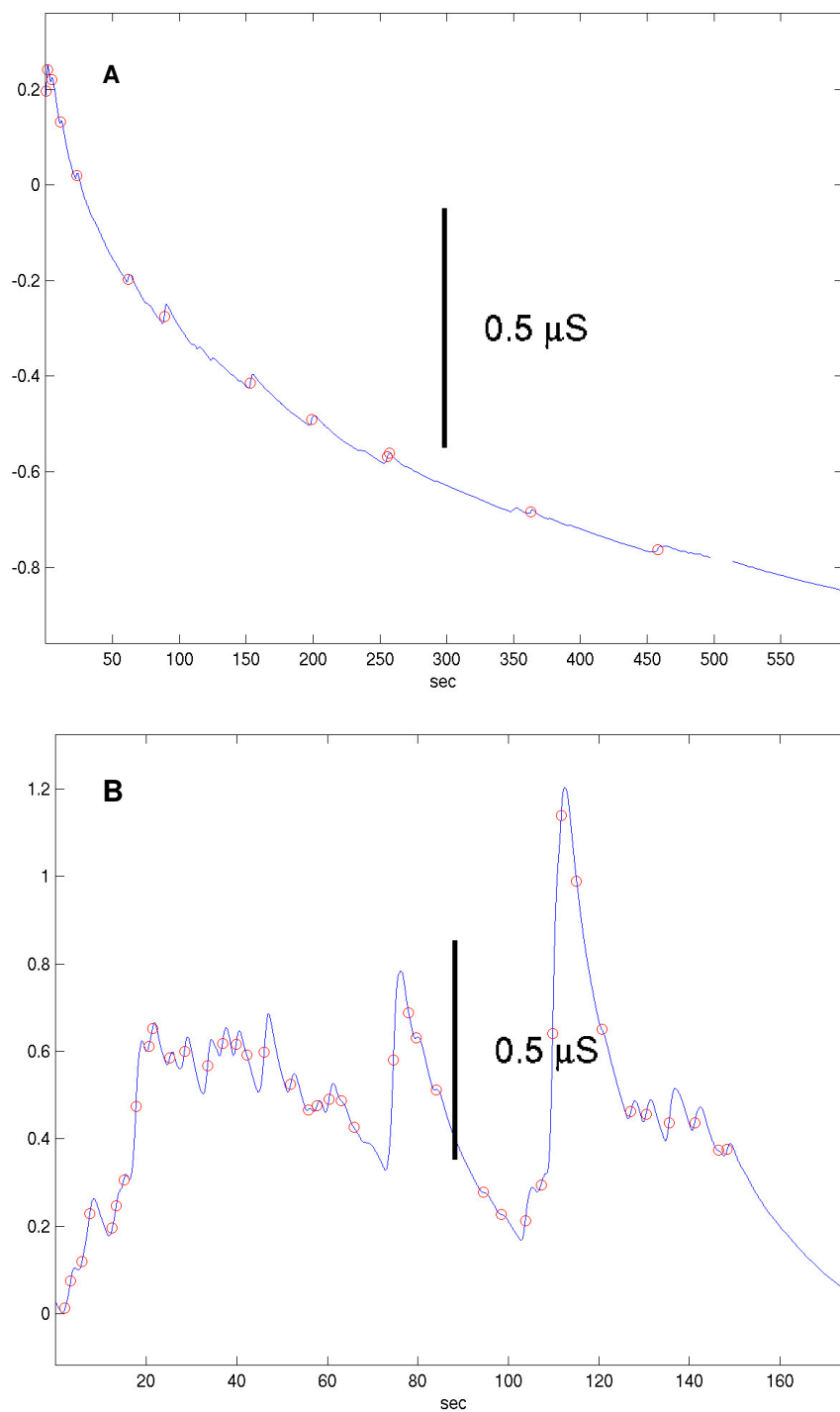
Infine, il segnale filtrato è stato ottenuto come media dei valori delle 100 serie interpolate, allineate temporalmente.

#### *Rilevazione delle risposte cutanee fasiche (oscillazioni spontanee)*

Le oscillazioni spontanee della resistenza cutanea si manifestano come variazioni dalla linea di base; tali variazioni sono state rilevate per mezzo di un approccio derivativo secondo la seguente linea:

- la derivata calcolata è stata ottenuta moltiplicando il segnale per una maschera di derivata di gaussiana mobile ( $\mu = 0$ ,  $\sigma = 70$  punti). In questo modo sono stati ridotti gli effetti del rumore sul segnale derivata.
- il segnale derivata ottenuto è stato filtrato mediante convoluzione con una maschera gaussiana ( $\mu = 0$ ,  $\sigma = 20$ ) con valor medio nullo. Questo ha permesso di depurare la derivata dalla eventuale deriva decrescente del segnale dovuta alla perdita di efficacia della pasta elettrolitica.

La serie temporale di questa “derivata corretta” assume i massimi valori in coincidenza con la fase di salita della resistenza cutanea. Tali massimi sono stati rilevati e dal loro conteggio è stata ricavata la frequenza media di risposte fasiche della resistenza cutanea per ogni condizione sperimentale (Fig. 20).



**Fig. 20.** Esempi di rilevazione di oscillazioni spontanee in un soggetto rappresentativo, in due condizioni sperimentali. Gli eventi di oscillazione sono segnati con un cerchio rosso. In A: risposta cutanea durante la condizione basale (BAS) in cui è presente la deriva decrescente del segnale. In B: risposta cutanea durante una condizione avversiva (VA).

## APPENDICE VII

### Risultati dettagliati della valutazione neuropsicologica

Test	sottoscale	SHYPO	Controlli
<b>Fluenza Semantica</b>		24,9±1.9	23,3±1.3
<b>Fluenza Fonemica</b>		14,1±1.4	16,6±1.9
<b>Fluenza Grafica</b>		18,4±2.1	17,7±1.5
<b>Matrici di Raven</b>		26,0±1.0	25,7±0.7
<b>Corsi</b>		5,9±0.3	5,0±0.2
<b>Digit</b>	<i>span</i>	5,6±0.2	6,0±0.3
	<i>inverso</i>	4,2±0.3	4,7±0.3
<b>Wechsler Memory Scale</b>	<i>Memoria logica</i>	10,7±1.1	10,8±0.9
	<i>informazioni</i>	5,8±0.1	5,7±0.2
	<i>orientamento</i>	5,1±0.1	5,1±0.1
	<i>controllo mentale esecutivo</i>	8,6±0.3	8,0±0.4
	<i>Ripetizione di cifre</i>	6,0±0.2	6,3±0.3
	<i>ripetizione inversa</i>	4,4±0.3	5,1±0.4
	<i>riproduzione visiva</i>	10,4±1.0	10,6±0.8
	<i>associazione di parole</i>	18,7±0.9	18,6±0.8
	<i>quoziente di memoria</i>	113,2±4.9	112,7±3.5
<b>Cubi di Kohs</b>	<i>compiti eseguiti</i>	15,0±0.9	15,4±0.6
	<i>punteggio</i>	111,3±8.2	115,2±5.8
<b>WAIS Cifrario</b>		81,9±3.5	83,3±3.5
<b>POMS</b>	<i>tensione e ansia</i>	54,0±4.3	46,0±2.2
	<i>depressione e avvillimento</i>	54,8±3.9	51,2±2.8
	<i>aggressività e rabbia</i>	60,8±4.2	46,4±2.1
	<i>vigore e attività</i>	49,0±3.5	59,4±4.3
	<i>stanchezza e indolenza</i>	62,7±6.2	56,1±2.3
	<i>confusione e sconforto</i>	53,8±4.8	53,4±4.1
<b>EMAS-S</b>	<i>CW</i>	51,3±3.1	46,9±2.4
	<i>AE</i>	55,2±2.6	45,9±1.1
	<i>TOT</i>	55,6±3.9	46,3±1.5
<b>EMAS-T</b>	<i>VS</i>	52,0±3.4	50,0±2.8
	<i>PF</i>	58,2±2.3	51,8±3.2
	<i>AM</i>	54,0±3.8	49,0±2.1
	<i>RQ</i>	55,4±3.2	45,2±2.1
<b>EMAS-P</b>	<i>1</i>	52,2±2.9	52,2±4.1
	<i>2</i>	53,4±3.7	58,9±2.3
	<i>3</i>	51,0±3.1	58,4±2.3
	<i>4</i>	52,4±3.1	51,3±4.4
	<i>5</i>	50,3±2.2	44,9±2.6

## BIBLIOGRAFIA

1. Ahern GL, Schwartz GE. Differential lateralization for positive and negative emotion in the human brain: EEG spectral analysis. *Neuropsychologia* 23(6): 745-55, 1985.
2. Aftanas LI, Pavlov S, Reva NV, Varlamov AA. Trait anxiety impact on the EEG theta band power changes during appraisal of threatening and pleasant visual stimuli; *International Journal of Psychophysiology* 50: 205-212, 2003
3. Alexander DM, Trengove C, Johnston P, Cooper T, August JP, Gordon E. Separating individual skin conductance responses in a short interstimulus-interval paradigm. *J Neurosci Methods* 146(1): 116-23, 2005
4. Armhein C, Muhlberger A, Pauli P, Wiedmann G. Modulation of event-related brain potentials during affective picture processing: a complement to startle reflex and skin conductance response? *International Journal of Psychophysiology* 54: 231-240, 2004
5. Baldini M, Vita A, Mauri MC, Amodei V. Psychopathological and cognitive features in subclinical hypothyroidism. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* Vol. 21, p.p. 925-935, 1997
6. Basar E, Basar-Eroglu C, Karakas S, Schurmann M. Gamma, alpha, delta and theta oscillation govern cognitive processes. *International Journal of Psychophysiology*, 39: 241-48, 2001
7. Bauer M, Whybrow PC. Thyroid hormones, neural tissue and mood modulation; *World J Biol Psychiatry* 7(2): 140-146, 2002
8. Beck RD Jr, Wasserfall C. Changes in hippocampal IL-15, related cytokines, and neurogenesis in IL-2 deficient mice. *Brain Res* 1041(2): 223-30, 2005
9. Belandia B, Latasa MJ, Villa A. Thyroid hormone negatively regulates the transcriptional activity of beta-amiloid precursor protein gene. *J Biol Chem* 273: 30366-30371, 1998
10. Bengel FM, Nekolla SG, Ibrahim T, Weniger C, Ziegler SI, Schwaiger M. Effect on thyroid hormones on cardiac function, geometry, and oxidative metabolism assessed noninvasively by positron emission tomography and magnetic resonance imaging; *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85(5): 1822-7, 2005
11. Bernal J, Pekonen F. Ontogenesis of the nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptor in the human foetal brain. *Endocrinology* 114: 677-679, 1984
12. Bigger TJ Jr, Fleiss JR. Frequency domain measures of heart period variability and mortality after myocardial infarction. *Circulation*, 85: 164-171, 1992
13. Biondi B, Fazio S, Palmieri EA, Carella C, Panza N. Left ventricular diastolic dysfunction in patients with subclinical hypothyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(6): 2064-7, 2005
14. Blair RJR. Facial expressions, their communicatory functions and neurocognitive substrates. *Phil Trans R Soc Lond B* 358: 561-572, 2003

15. Bradley DJ, Towle HC. Spatial and temporal expression of alpha and beta hormone receptor mRNAs, including the beta2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci* 12: 2288-2302, 1992
16. Cardoso JF, Laheld B. Equivariant adaptive source separation. *IEEE Transactions on Signal Processing*. 45: 434–444, 1996
17. Christie IC. Multivariate Discrimination of Emotion-Specific Autonomic Nervous System Activity; Thesis submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute, 2002
18. Collet C, Vernet-Maury E, Delhomme G. Autonomic nervous system response patterns specific to basic emotions. *Journal of Autonomic Nervous System* 62: 45-57, 1997
19. Collet L. Autonomic nervous system response patterns specificity to basic emotions. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 62: 45-57, 1997
20. Coulombe P, Dussault JH, Walker P. Plasma catecholamine concentrations in hypothyroidism and hyperthyroidism. *Metab. Clin. Exp.* 25(9): 973-9, 1976
21. Critchley HD, Corfield DR, Chlander MP; Cerebral correlates of autonomic cardiovascular arousal: a functional neuroimaging investigation in humans; *Journal of Physiology*, 523(1): 259-270, 2000
22. Damasio AR. Emotion in the perspective of an integrated nervous system. *Brain Research Reviews* 26: 83-86, 1998
23. Davidson RJ, Abercrombie H, Nitschke JB, Putnam K. Regional brain function, emotion and disorders of emotion. *Current Opinion in Neurobiology*, 9: 228-234, 1999
24. De Kloet ER. Hormones, brain and stress; *Endocrine Regulations*, 37: 51-68, 2003
25. De Lange FP. Endemic cretinism. In: Braverman. *The thyroid*. Lippincott, J. B., New York, 756-765, 1996
26. Delplanque S, Silvert L, Hot P, Sequiera H. Event-related P3a and P3b in response to unpredictable emotional stimuli. *Biological Psychology* 68:107-120, 2005
27. De Pascalis V, Ray WJ, Tranquillo I, D'Amico D. EEG activity and heart rate during recall of emotional events in hypnosis: relationships with hypnotizability and suggestibility. *Int J Psychophysiol* 29(3): 255-275, 1998
28. Corvilain DB, Maenhaut C. *The Phylogeny, Ontogeny, Anatomy, and Metabolic Regulation of the Thyroid*, 2002
29. Ekman P. Universals and cultural differences in facial expressions of emotion. In J. Cole (Ed.), *Nebraska symposium on motivation*, 1971 (pp. 207-282). Lincoln: University of Nebraska Press, 1972.
30. Ekman P, Levenson RW, Friesen WV (1983). Autonomic Nervous System Distinguishes Among Emotions. *Science*, 221: 1208-1210, 1992
31. Ekman P, Sorenson E R, Friesen W. Pan-cultural elements in facial displays of emotion. *Science*, 164: 86-88, 1969.
32. Erickson K, Schulkin J. Facial expression of emotion: a cognitive neuroscience perspective. *Brain and Cognition* 52 52-60, 2003

33. Ewins DL, Rossor MN, Butler J, Roques PK, Mullan MJ, McGregor AM. Association between autoimmune thyroid disease and familial Alzheimer's disease. *Clin Endocrinol* 35: 93-96, 1991
34. Foster PS, Harrison DW. The relationship between magnitude of cerebral activation and intensity of emotional arousal. *International Journal of Neuroscience* 112(12): 1463-77, 2002
35. Gary KA, Sevarino KA, Yarbrough GG, Prange AJ Jr, Winokur A. The thyrothopin-releasing hormone (TRH) hypotesis of homeostatic regulation: implications for TRH-based therapeutics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 305: 410-416, 2003
36. Gemignani A, Santarcangelo E, Sebastiani L, Marchese C, Mammoliti R, Simoni A, Ghelarducci B. Changes in autonomic and EEG patterns induced by hypnotic imagination of aversive stimuli in man. *Brain Res Bull* 53(1): 105-11, 2000
37. Genovesi G, Paolini P, Marcellini L, Vernillo E, Salvati G, Polidori G, Ricciardi D, de Nuccio I, Re M.; Relationship between autoimmune Thyroid disease and Alzheimer's disease; *Panminerva Med.* 38, 61-63, 1996
38. Gomez P, Zimmermann P, Guttormsen-Schar S, Danuser B. Respiratory responses associated with affective processing of film stimuli, *Biol Psychol.* 68(3):223-35, 2004
39. Gonen M.S., Kisakol G., Cilli A.; Assessment of anxiety in subclinical thyroid disorders; *Endocrine Journal*, 51(3), 311-315, 2004
40. Gray CM; Emotional modulation of cognitive control: approach-withdrawal states double-dissociate special from verbal two-back task performance; *Journal of Experimental Psychology: General.* 3: 436-452, 2001
41. Gray CM, Singer W. Stimulus-specific neuronal oscillations in orientation columns of cat visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86: 1698–1702, 1989
42. Gussekloo J, Exel E, de Craen AJ. Thyroid status, disability and cognitive function, and survival in old age. *Jama* 292(21):2591-9. 21, 2004
43. Hagemann D, Waldstein SR, Thayer JF. Central end autonomic nervous system integration in emotion; *Brain and Cognition* (52) 79-87, 2003
44. Hagemann D, Naumann E, Maier S, Becker G, Lurken A, Bartussek D. The assessment of affective reactivity using films: validity, reliability and sex differences. *Personality and Individual Differences*, 26: 627–639, 1999
45. Haggerty JJ Jr, Prange AJ Jr; Borderline Hypothyroidism and depression; *Annu. Rev. Med.* 46: 37-46, 1995
46. Haupt M, Kurz A; Reversibility of dementia in hypothyroidism; *J.Neurol.* 240: 333-335, 1993
47. Hruby T, Marsalek P. Event-Related Potentials- the P3 wave; *Acta Neurobiol. Exop.* 63: 55-63, 2003



48. Hubert W, Jong-Meyer R. Autonomic, neuroendocrine, and subjective responses to emotion-enducing film stimuli. *International journal of Psychophysiology* 11:131-140, 1991
49. Inanaga K. Frontal midline theta rhythm and mental activity. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 52: 555-66, 1998
50. James S, Spottiswoode P, May B.Sc & E.C. Skin Conductance Prestimulus Response: Analyses, Artifacts and a Pilot Study. *Journal of Scientific Exploration*, 17 (4): 617-641, 2003
51. Jensovsky J, Ruzicka E, Spackova N. Changes of event related potential and cognitive processes in patients with subclinical hypothyroidism after thyroxine treatment; *Endocrine Regulations* (36) 155-122, 2002
52. Jones NA, Fox NA. Electroencephalogram asymmetry during emotionally evocative films and its relation to positive and negative affectivity. *Brain and Cognition* 20(2): 280-99, 1992
53. Kek PC, Khoo DH. Subclinical thyroid disease; *Singapore Med J* 44(11): 595-600, 2003
54. Klein I, Ojaama K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl Med* 344 (7): 517-44, 2001
55. Klimesch W. Memory processes, brain oscillations and EEG synchronization. *Int J Psychophysiol* 24:61-100, 1996
56. Klimesch W, Doppelmayr M, Schwaiger J, Auinger P, Winkler TH. "Paradoxical" alpha synchronization in a memory task. *Cognitive Brain Res.* 7: 493-501, 1999
57. Konings CH. Plasma thyrotropin bioactivity in Down's syndrome children with subclinical hypothyroidism. *Eur.J. Endocrinol.* 144: 1-4, 2001
58. Kubota Y, Sato W, Toichi M. Frontal midline theta rhythm is correlated with cardiac autonomic activities during the performance of an attention demanding meditation procedure; *Cognitive Brain Research* 11: 281-287, 2001
59. Lacey BC, Lacey JL. Some autonomic-central nervous system interrelationships; *Physiological Correlates of Emotion*, New York, Academic Press, 205-227, 1970
60. Lang PJ, Bradley MM, Cuthbert BN. Emotion, motivation and anxiety: Brain mechanisms and psychophysiology. *Biological Psychiatry*, 44: 1248-1263, 1998
61. Lang PJ. A bio-informational theory of emotional imagery. *Psychophysiology* 16: 495-512, 1979
62. Lang P J. What are the data of emotion? V Hamilton, GH Bower, NH Frijda (Eds.), *Cognitive perspectives on emotion and motivation* (173-191). New York: Kluwer Academic/Plenum, 1988
63. Lang PJ, Öhman A, Vaitl D. The international affective picture system (photographic slides). Center for Research in Psychophysiology, University of Florida: Gainesville, FL., 1988
64. Lang PJ, Greenwald MK, Bradley MM, Hamm AO. Looking at pictures: affective, facial, visceral, and behavioral reactions. *Psychophysiology* 30(3): 261-73, 1993

65. Larsen PR, Berry MJ; Nutritional and hormonal regulation of thyroid hormone deiodinases; *Annu. Rev. Nutr.* 15:323-52, 1995
66. Lauder JM, Mugnaini E. Early hyperthyroidism alters the distribution of mossy fibers in the rat hippocampus. *Nature* 268: 335-337, 1977
67. Lazarus RS. *Emotion and adaptation*. London: Oxford, 1991
68. Lee GP, Meador KJ, Loring DW, Allison JD, Brown WS, Paul LK, Pillai JJ, Lavin TB. Neural substrates of emotion as revealed by functional magnetic resonance imaging. *Cognitive and Behavioural Neurology* 17(1): 9-17, 2004
69. Leentjens AF, Kappers EJ. Persistent cognitive defects after corrected hypothyroidism; *Psychopathology*, 28: 235-237, 1995
70. Levenson W. Blood, sweat and fears. The autonomic architecture of emotion; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1000: 348-366, 2003
71. Lohmeier TE. The sympathetic nervous system and long-term blood regulation; *American Journal of Hypertension*. 14: 1475-1545, 2001
72. Loosen PT. Effects of thyroid hormones on central nervous system in aging; *Psychoneurology* 17(4), 335-374, 1992
73. Luo L, Stopa EG. Thyrotropin releasing hormone inhibits tau phosphorylation by dual signaling pathways in hippocampal neurons. *J Alzheimers Dis.* 6(5):527-36, 2004
74. Luu P, Tucker Don M, Makeig S. Frontal midline theta and the error-related negativity: neurophysiological mechanisms of action regulation. *Clinical Neurophysiology*, 115: 1821-35, 2004
75. Makeig S, Westerfield M, Jung TP, Covington J. Functionally independent components of the late positive event-related potential during visual spatial attention. *The Journal of Neuroscience*. 19(7): 2665-2680, 1999
76. Malik, Chairman; Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *European Heart Journal* 17: 354-381, 1996
77. McCraty R, Atkinson M, Tiller W, Rein G. The effects of emotions on short-term power spectrum analysis of heart rate variability. *Journal of* 76(14):1089-93, 1995
78. McFarland DJ, Miner LA, Vaughan TM, Wolpaw JR. Mu and beta rhythm topographies during motor imagery and actual movements. *Brain Topogr* 12(3): 177-86, 2000
79. Mizuki Y, Kajimura N, Kai S, Suetsugi M, Ushijima I, Yamada M. Differential responses to mental stress in high and low anxious normal humans assessed by frontal midline theta activity. *Int J Psychophysiol* 12(2): 169-78, 1992
80. Monzani F, Del Guerra P, Caraccio N, Pruneti CA, Pucci E, Luisi M, Baschieri L. Subclinical hypothyroidism: neurobehavioural features and beneficial effects of L-thyroxine treatment; *Clin. Invest.* 71(5), 367-371, 1993
81. Montano N, Ruscone TG, Porta A, Lombardi F, Pagani M, Malliani A. Power Spectrum Analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt, *Circulation* 90(4): 1826-31, 1994

82. Morecraft RJ, Stilwell KS, MA, Rossing WR. The motor cortex and facial expression: new insight from neuroscience. *The Neurologist*. (5):235-49, 2004
83. Niskanen J, Tarvainen M, Ranta-aho P, Karjalainen P. Software for advanced HRV analysis. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 76 (1): 73-81, 2004
84. Nyklicek I, Thayer JF, Van Doornen LJP. Cardiorespiratory differentiation of musically-induced emotions. *Journal of Psychophysiology*, 11: 304-321, 1997
85. Ori Z, Monir G, Weiss J, Sayhouni X, Singer DH. Heart rate variability. Frequency domain analysis. *Cardiol Clin*. 10(3): 499-537, 1992
86. Palomba D, U, Sarlo M, Angrillia A, Minia A, Stegagno L. Cardiac responses associated with affective processing of unpleasant film stimuli (1):45-57, 1999
87. Palomba D., Sarlo M., Stegagno L.; Cardiac responses associated with affective processing of unpleasant film stimuli. *Int J Psychophysiol* 36:45-57, 2000
88. Pantev C. Evoked and induced gamma-band activity of the human cortex. *Brain Topogr* 7: 321-30, 1995
89. Perry E., Walker M.; Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness?. *Trends Neurosci*. 22, 273-280, 1999
90. Phan KL, Taylor SF, Liberzon I. Functional neuroanatomy of emotion: a meta-analysis of emotion activation studies in PET and fMRI. *NeuroImage* 16: 331-348, 2002
91. Pohost GM, Hung L, Dole M. Clinical use of cardiovascular magnetic resonance. *Circulation* 108: 647-653, 2003
92. Porges WS. Cardiac vagal tone: a physiological index of stress *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (2) 225-233, 1995
93. Prange AJ Jr. Enhancement of imipramine by thyroid stimulating hormone. *Am. J. Psychiatry*, 127: 191-199, 1970
94. Pulvermuller F, Birbaumer N, Lutzenberger W, Mohr B. High-frequency brain activity: its possible role in attention, perception and language processing. *Prog Neurobiol* 52: 427-445, 1997
95. Reyclin S. Intellectual functions in myxedema. *Arch. Neurol. Psychiat.* 69, 436-449
96. Rinn WE. The neuropsychology of facial expression: a review of the neurological and psychological mechanisms for producing facial expressions. *Psychological Bulletin* 95, 1: 52-77, 1998
97. Ripoli A, Pingitore A, Favilli B, Bottoni A, Turchi S, Osman NF, De Marchi D, Lombardi M, L'Abbate A, Iervasi G. Does subclinical hypothyroidism affect cardiac pump performance? Evidence from a magnetic resonance imaging study. *J Am Coll Cardiol*.45(3):439-45, 2005
98. Rodriguez E, George N, Lachaux JP, Martinerie J, Renault B, Varela FJ Perception's shadow: long-distance synchronization of human brain activity. *Nature* 397 :430-3, 1999
99. Rolls ET. *Precis of the brain and emotion*; Behavioral and Brain Sciences 23: 177-234, 2000

100. Rosen JB, Schulkin J. From normal fear to pathological anxiety. *Psychol Rev* 105: 325-350, 1998
101. Rottemberg J, Ray RR, Gross JJ. (in press). Emotion elicitation using films. In J.A. Coan e J.J.B. Allen (Eds.), *The handbook of emotion elicitation and assessment*. New York: Oxford University Press
102. Sarlo M, Palomba D, Angrilli A, Stegagno L. Blood phobia and spider phobia: two specific phobias with different autonomic cardiac modulations; *Biological Psychology* 60: 91-108, 2002
103. Sarter M, Bruno JP. Abnormal regulation of cortical cholinergic neurons and impaired information processing in neuropsychiatric disorders. *Trends Neurosci* 22: 67-74, 1999
104. Saudou F, Amara DA. Enhanced aggressive behaviour in mice lacking 5HT1B receptor. *Science* 265: 1875-1878, 1994
105. Schaefer A, Nils F, Sanchez X, Phillipot P. A multi criteria assessment of emotional film; University of Louvran, Louvran-La-Neuve, Belgium; in press 2005
106. Schellberg D, Besthorn C, Klos T, Gasser T. EEG power and coherence while male adults watch emotional video films. *International Journal of Psychophysiology* 9(3): 279-91, 1990
107. Schmidt K, Cohn JF. Humanfacial expressions as adaptations: evolutionary questions in facial expression research. *Yearbook of Physical Anthropology*. 44: 3-24, 2001
108. Schupp HT, Junghofer M, Weike A, Hamm A. Attention and emotion: an ERP analysis of facilitated emotional stimulus processing. *Cognitive neuroscience and neuropsychology* (8):1107-10, 2003
109. Schupp HT, Cuthbert B, Bradley MM, Hillman CH. Brain processes in emotional perception: Motivated attention. *Cognition and Emotion* 18(5), 593-611, 2004
110. Schupp HT, Cuthbert B, Bradley MM. Affective picture processing: the late positive potential is modulated by motivational relevance. *Psychophysiology* 37: 257-261, 2000
111. Schupp HT, Junghofer M, Weike AI, Hamm AO. The selective processing of briefly presented affective pictures: an ERP analysis. *Psychophysiology* 41: 441-449, 2004
112. Sher L. The role of brain thyroid hormones in the mechanisms of seasonal changes in mood and behaviour. *Medical Hypothesis* 55(1) 56-59, 2000
113. Simon NM, Blacker D, Korbly N, Sharma SG. Hypothyroidism and Hyperthyroidism in anxiety disorders revisited: new data and literature review. *Journal of Affective Disorders* 69: 209-217, 2002
114. Singer W, Gray CM. Visual feature integration and the temporal correlation hypothesis. *Annu Rev Neurosci*. 18: 555-86, 1995
115. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use, *Circulation* 93(5): 1043-65, 1996
116. Taylor Edwin W, Jordan, Coote JH. Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. *Physiological Review* 79(3):855-916 1999

117. Trengove C. *Journal of Neuroscience Methods* 146:116-123, 2005
118. Teplan M, Krakovska A, Stolc S. EEG responses to long-term audio-visual stimulation. *Int J Psychophysiol*, 2005 in print
119. Tiitinen H, Sinkkonen J, Reinikainen K, Alho K, Lavikainen J, Naatanen R. Selective attention enhances the auditory 40-Hz transient response in humans. *Nature* 364: 59-60, 1993
120. Toide K. Effects of scopolamine on extracellular acetylcholine and choline levels and on spontaneous motor activity in freely moving rats measured by brain dialysis. *Pharmacol. Biochem. Behave.* 33: 109-113, 1989
121. Tuzcu A, Bahceci M, Gokalp D, Tuzun Y. Subclinical hypothyroidism may be associated with elevated C-reactive protein(low grade inflammation) and fasting hyperinsulinemia; *Endocrine Journal* 52(1) 89-94, 2005
122. Vaidya VA, Castro ME, Pei Q. Influence of thyroid hormone on 5HT1A and 2A receptor mediated regulation of hippocampal BDNF mRNA expression. *Neuropharmacology* 40: 48-56, 2001
123. Van Praag HM. Can stress cause depression? *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 28: 891-907, 2004
124. Venables PH, Christie MJ. Electrodermal activity. Martin, I., Venables, PH Eds. ,*Techniques in Psychophysiology*. Wiley, Chichester, 1980
125. Volpato S, Guralnik JM, Fried LP, Remaley AT, Cappola AR, Launer LJ. Serum thyroxine level and cognitive decline in euthyroid older women. *Neurol.* 58: 1055-1061, 2002
126. Von Stein A, Sarnthein J. Different frequencies for different scales of cortical integration: from local gamma to long range alpha/theta synchronization. *Int J Psychophysiol.* 38(3) 301-13, 2000
127. VranaSR, CuthbertBN, Lang PJ. Fear imagery and text processing. *Psychophysiology*, 23: 247-253, 1986
128. Watanuki S, Kim JK. Physiological responses induced by pleasant stimuli. *Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Science.* 24: 135-138, 2005
129. Wheeler RE, Davidson RJ, Tomarken AJ. Frontal brain asymmetry and emotional reactivity: a biological substrate of affective style. *Psychophysiology.* 30(1): 82-9, 1993
130. Yeragani V, Pohl R, Berger R, Balon R, Ramesh C, Glitz D. Decreased Heart Rate Variability in Panic Disorder Patients: a Study of Power-Spectral Analysis of Heart Rate; *Psychiatric Research.* 46:89-103, 1993
131. Zhang J. Decomposing stimulus and response component waveforms in ERP. *Journal of Neuroscience Methods* 80: 49-63, 1998